

Université de Montréal

# **Développement de l'activité rythmique chez l'embryon du poisson-zébré**

par

Joel Ryan

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de maître en  
pathologie et biologie cellulaire  
option neurosciences

Décembre 2010

© Joel Ryan, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Développement de l'activité rythmique chez l'embryon du poisson-zébré

Présenté par :

Joel Ryan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nicole Leclerc, président-rapporteur  
Louis Saint-Amant, directeur de recherche  
Pierre Drapeau, membre du jury

## Résumé

Les circuits neuronaux peuvent générer une panoplie de rythmes. Nous pouvons séparer les mécanismes de création de ces rythmes en deux grands types. Le premier consiste de circuits contrôlés par des cellules « pacemakers », ayant une activité rythmique intrinsèque, comme dans le ganglion stomatogastrique des crustacés. Le deuxième consiste de circuits multi-neuronaux connectés par un réseau synaptique qui permet une activité rythmique sans la présence de neurones pacemakers, tel que démontré pour les circuits de la nage chez plusieurs vertébrés. Malgré nos connaissances des mécanismes de rythmogénèse chez les vertébrés adultes, les mécanismes de la création et la maturation de ces circuits locomoteurs chez les embryons restent encore inconnus.

Nous avons étudié cette question à l'aide du poisson-zébré où les embryons débutent leur activité motrice par des contractions spontanées alternantes à 17 heures post-fertilisation (hpf). Des études ont démontré que cette activité spontanée n'est pas sensible aux antagonistes de la transmission synaptique chimique et ne requiert pas le rhombencéphale. Après 28 hpf, les embryons commencent à nager et se propulser en réponse au toucher. Des études antérieures ont démontré que l'apparition de la nage nécessite le rhombencéphale et la transmission synaptique chimique. Cette thèse explore la possibilité que ces changements comportementaux représentent la progression d'un circuit contrôle par un pacemaker à un circuit où le rythme provient d'un circuit distribué.

En mesurant le groupement des contractions de l'activité spontanée, plutôt que la fréquence moyenne, nous avons découvert une nouvelle forme d'activité spontanée qui débute à 22 hpf. Cette activité consiste de deux contractions alternantes à succession très rapide. Contrairement à l'activité spontanée présente dès 17 hpf cette nouvelle forme d'activité requiert le rhombencéphale et la transmission synaptique chimique, comme démontré pour la nage qui apparaît à 28 hpf. Cette forme de comportement intermédiaire représente potentiellement une étape transitoire lors de la maturation des circuits moteurs.

**Mots-clés :** activité rythmique, circuit neuronal moteur, CPG, neurobiologie développementale

## Abstract

Neuronal circuits are capable of generating diverse forms of rhythmic activity. Mechanisms underlying rhythmogenesis can be separated into two main groups. First, pacemaker central pattern generators (CPGs) are composed of neurons that have intrinsic oscillatory properties, such as the lobster stomatogastric ganglion. Second, CPGs driven by network-based dynamics rely on synapse-mediated cell properties, such as locomotion in aquatic vertebrates. Despite an existing wealth of knowledge obtained through studying frog and lamprey swimming CPGs, the means by which a locomotor CPG develops remains elusive. Here, we propose to address this question using the zebrafish embryo, for its rapid development, optical transparency and stereotyped behaviour.

Motor activity in zebrafish embryos begins with spontaneous activity around 17 hours post-fertilization (hpf). Studies have shown that this activity is not sensitive to antagonists of chemical neurotransmission, and does not require the hindbrain. By 28 hpf, they become able to swim, and generate low-amplitude alternating contractions at a rate of 30 Hz. This study explores the developmental window between the onset of motility and the onset of a mature locomotor output, such as swimming, with the objective of uncovering key steps in motor network maturation.

By measuring the grouping of contractions rather than overall frequency of spontaneous activity, we uncovered a novel form of spontaneous activity, starting around 22 hpf. This activity consists of two alternating contractions in rapid succession. In contrast to early spontaneous activity, this motor activity requires glutamatergic neurotransmission and input from the hindbrain, as previously shown for swimming at 28 hpf. This intermediate behavior may reveal an important step in the maturation of the motor network.

**Keywords :** rhythmic activity, CPG, motor network, developmental neurobiology

# Table des matières

Introduction .....	1
Activité motrice embryonnaire (Historique) .....	1
Central pattern generators (CPG) .....	4
Le poisson-zébré comme modèle animal .....	7
Développement de l'activité motrice chez l'embryon du poisson-zébré .....	8
Anatomie de la moelle épinière poisson-zébré .....	9
Caractéristiques du circuit neuronal sous-jacent aux activités motrices embryonnaires ..	10
Fonctionnement d'un circuit neuronal CPG intrinsèque .....	12
Fonctionnement d'un circuit neuronal CPG à dynamiques de réseaux .....	13
Matériel et méthodes .....	16
Elevage et entretien des poissons .....	16
Marquage par anticorps fluorescents .....	16
Microinjections .....	17
Pharmacologie .....	17
Analyses comportementales .....	17
Dissociation et culture cellulaire et imagerie calcique .....	18
Chapitre 1 Analyses comportementales du mutant <i>touché</i> ainsi que la morphologie générale des cellules sensorielles Rohon-Beard (Low et al 2010) .....	20
Introduction .....	21
Résultats .....	22
Discussion .....	32
Chapitre 2 Localisation anatomique du circuit neuronal minimal pour la réponse au toucher et l'activité spontanée .....	33
Introduction .....	34
Résultats .....	35
Rôle critique de la moelle épinière rostrale dans les comportements immatures .....	37

Discussion .....	42
Chapitre 3 Étude du groupement des contractions spontanées chez l'embryon du poisson- zébré et pharmacologie .....	44
Introduction .....	45
Pharmacologie de l'activité spontanée.....	45
Groupement des contractions spontanées .....	47
Résultats .....	49
Activité spontanée transitoire dépendant du glutamate .....	49
Pharmacologie de l'activité spontanée.....	55
Discussion .....	58
Conclusion .....	61
Mécanismes de l'activité spontanée.....	61
Rôles de l'activité spontanée.....	62
Bibliographie.....	64
Annexe 1 .....	i
Annexe 2 .....	v
Annexe 3 .....	xxxviii

## Liste des tableaux

Tableau I. Statistiques de la figure 2

Tableau II. Statistiques de la figure 6

Tableau III. Statistiques de la figure 9

Tableau IV. Statistiques de la figure 10

## Liste des figures

Figure 1 *touché* mutants fail to respond to light-touch, but respond to tail-pinching

Figure 2 Fréquence de contractions spontanées moyenne d'embryons de type sauvage (WT) et de type mutant *touché*

Figure 3 *touché* mutants respond normally to noxious stimuli

Figure 4 *touché* mutants lack a stopping response.

Figure 5 Gross morphology of sensory neurons in *touché* mutants appears normal.

Figure 6 Touch-response requires the rostral somites of the spinal cord, but not the hindbrain

Figure 7 L'activité spontanée persiste dans des embryons lésés

Figure 8 Imagerie calcique dans des cellules dissociées de l'embryon du poisson-zébré.

Figure 9 Schéma de différents patrons d'activité spontanée, soient des contractions individuelles isolées

Figure 10 Distribution des intervalles entre les contractions spontanées

Figure 11 Distribution des intervalles chez le mutant *touché*

Figure 12 Résultats préliminaires du traitement d'embryons à 22 hpf avec des bloqueurs de canaux calciques, de canaux potassiques activés par le calcium, et de récepteurs glycinergiques



## Liste des abbréviations

AMPA, acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique  
APV, 'cide 2-amino-5-phosphonovalérique  
CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione  
CPG, « Central pattern generator »; générateur central d'activité rythmique  
eGFP, « enhanced Green Fluorescent Protein », protéine fluorescente verte  
Hpf, heures post-fertilisation  
GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
MO, Oligonucléotides morpholino  
NMDA, acide N-méthyl-D-aspartique  
PD, depolarisations périodiques  
SB, bouffées d'activité synaptiques  
WT, de type sauvage

*À mon oncle Gaston*

## Remerciements

Je tiens à remercier Dr. Louis Saint-Amant. En tant que son premier étudiant, et en ayant mis à l'épreuve sa patience à nombreuses reprises, je crois qu'il a bien su me guider à travers ce projet de recherche. Les nombreuses discussions de résultats ont été à source à la fois de formation et d'inspiration. Je remercie Mathieu Lachance pour son support technique et parfois moral dans le laboratoire. De plus, je tiens à souligner l'excellent travail du personnel de l'animalerie.

Le Dr. Pierre Drapeau était toujours abordable et source de précieux conseils, de critiques constructives ainsi que d'histoires intéressantes, quoique parfois douteuses, autour d'une bière. Les étudiants de son laboratoire m'ont brillamment procuré une inestimable distraction, tout en étant d'excellents complices fêtards lors de conférences scientifiques.

Je remercie le Dr. Sean E. Low (Esq), qui a été indispensable dans ma formation. Il a su me guider et m'inclure au quotidien à travers son projet de recherche, une expérience académique que je considère comme un point tournant dans mes études.

Je remercie le Dr. John Basso, à l'Université d'Ottawa. Les analogies entre la biologie moléculaire et les dessins animés de Bugs Bunny me resteront en tête longtemps.

Mille mercis à Laura.

Finalement, un énorme merci à mon père, à ma mère, à mon frère et à ma sœur qui m'ont toujours supporté, encouragé, guidé et gâté, chacun à sa façon

## Introduction

La vie se perpétue par une myriade d'évènements cycliques et rythmiques où différentes composantes ont lieu en suivant une chronologie bien précise. Par exemple, on considère l'ensemble des étapes que passe un embryon dès sa conception et jusqu'à sa mort comme le cycle d'une vie. À l'intérieur de cette vie, des cycles circadiens, se répétant quotidiennement, assurent un rythme d'alternance éveil-sommeil qui définissent nos jours. Une activité rythmique assure un cycle d'inspiration-expiration à tous les cinq secondes en moyenne. Une autre assure un battement cardiaque ajustable à environ chaque seconde.

On trouve en fait des rythmes presque partout en biologie, et les neurosciences n'en font pas exception. Dans le système nerveux central, une multitude d'ensembles de circuits neuronaux montre une activité rythmique et contrôle des activités motrices telles la respiration, la mastication, et la locomotion, et ce à travers toute la diversité animale existante (Ben-Ari 2001). Chez l'humain, plusieurs circuits neuronaux participent à une forme d'activité rythmique en réponse à un stimulus musical, lors de la perception du rythme, et de la réponse locomotrice (Large et Snyder 2009).

L'ensemble des mécanismes par lesquels les circuits rythmiques se développent et fonctionnent demeure un sujet de recherche important en neurobiologie. Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans le développement d'un circuit rythmique, nous utilisons l'embryon du poisson-zébré comme modèle expérimental. L'observation du comportement étant à la base de la biologie, nous avons analysé les comportements moteurs de l'embryon du poisson-zébré afin de mesurer l'activité résultante du circuit neuronal sous-jacent à la locomotion dans la moelle épinière.

### Activité motrice embryonnaire (Historique)

Le comportement embryonnaire a longtemps suscité l'intérêt de différents biologistes, que ce soit d'un point de vue zoologique, anatomique, ou neurologique. L'observation du comportement figure parmi les éléments fondamentaux de la recherche en

biologie. Les premiers scientifiques à décrire et rapporter une activité motrice ou motilité embryonnaire furent William Harvey, le physicien britannique du 17<sup>e</sup> siècle, puis Jan Swammerdam, entomologiste hollandais au tournant du 17<sup>e</sup> siècle qui mis sur papier *Bibel del Natur* (« Bible de la Nature », publication post-hume en 1752, cité via Coghill et Legner 1937).

Leur observations, quoiqu'importantes, ont été plutôt ignorés jusqu'à la fin du 19<sup>e</sup> siècle. Dans son oeuvre classique, *Specielle Physiologie des Embryo* (1885, traduction par Coghill et Legner, 1937) Wilhelm Preyer, discute d'une motilité «sans stimuli détectables», chez des embryons d'invertébrés avant qu'ils ne sortent de l'œuf. On attribue la conception du domaine d'étude du développement de l'activité motrice à Preyer, vu l'ampleur de son oeuvre (Hamburger 1963).

Dans *Some aspects of the embryology of behavior* (1963), Viktor Hamburger rapporte l'historique de la recherche sur la motilité embryonnaire depuis l'oeuvre de Preyer, en 1885. Je résumerai ici cet historique de recherche.

Preyer rapportait l'apparition de motilité embryonnaire qui précédait toute réponse motrice à différents stimuli (Preyer 1885). Toutefois, ses travaux ont été quelques peu ignorés pendant environ 30 ans. À l'époque, le domaine de l'étude du développement du comportement était dominé par la théorie que tout comportement était initié par un réflexe, soit en réponse à divers stimuli sensoriels. Ainsi, les *réflexologistes* de l'époque rejetaient l'idée qu'une activité motrice pouvait avoir lieu de façon spontanée, soit indépendamment à toute stimulation sensorielle.

Cette théorie fut opposée par Coghill. Il cherchait les corrélations entre l'anatomie et la physiologie avec le comportement lors du développement du système nerveux central. Il caractérisa l'activité motrice embryonnaire de l'axolotl, *Amblystoma*, dans *Anatomy and the problem of behaviour* (1929), puis a fait l'argument que le système nerveux ait développé des patrons d'activité motrice avant que l'animal ne soit sensible à des stimuli externes.

Cette position était semblable à celle de Preyer, et ce malgré que l'embryon de l'axolotl ne soit que peu actif spontanément. Les observations de Coghill nécessitaient la

stimulation mécanique de l'embryon afin d'élucider des mouvements. Toutefois, Coghill argumente que la précocité développementale des systèmes moteurs semblait suggérer leur autonomie fonctionnelle, indépendante aux réflexes.

L'œuvre de Coghill se base sur l'observation du comportement et met en valeur l'étude des subtilités du comportement de l'embryon de l'axolotl. Cette étude permettait une déduction de la physiologie sous-jacente, nécessitant bien sûr une certaine connaissance de l'anatomie neuronale présente. Ainsi, il a suggéré que des changements subtils dans le comportement des embryons pouvaient souligner des changements à la physiologie sous-jacente.

Par la suite, l'idée qu'un système central moteur générerait l'activité fut supportée par les travaux de Hamburger dans l'embryon du poulet (*Gallus gallus*), caractérisant d'abord les comportements moteurs embryonnaires.

La motilité embryonnaire spontanée du poulet apparaît avant la réponse au toucher. En effet, l'activité motrice débute vers 3.5 jours par des contractions subtiles au niveau des somites les plus rostraux. Ensuite les contractions s'étendent dans la direction céphalo-caudale. Il est présumé que ce phénomène est dû au développement des somites progressant dans la même direction. À 4 jours, les contractions en S débutent, c'est-à-dire la succession rapide de deux contractions, la deuxième ayant lieu contralatéralement à la première, et débutant avant que la première n'ait fini. Par la suite, d'autres parties anatomiques participent à la motilité. À 7 jours de développement, soit 3 jours après l'apparition des mouvements spontanés, l'embryon de poussin devient sensible aux stimulations tactiles (Hamburger et Hamilton 1957). La fermeture d'un circuit entre les neurones sensoriels et le complexe moteur via des connections synaptiques interneuronales coïncide avec l'apparition de la réponse au toucher (Visintini et Levi-Montalcini 1939, rapporté par Hamburger 1963).

Par la suite, des lésions de la moelle épinière abolissant tout influx provenant du système sensoriel ou du cerveau ont été exécutés sur des embryons de poulet à 2.5 jours (Hamburger et al 1966). La persistance de l'activité spontanée de ces embryons lésés a

supporté l'idée que le système moteur pouvait se développer et fonctionner sans influx sensoriel, et la théorie de l'origine réflexogénique de la motilité était de moins en moins supportée. Grillner rappelle que malgré l'autonomie du système moteur, l'influx sensoriel peut grandement moduler tout comportement moteur (Grillner 1985).

Il est important de noter que chez les mammifères, l'apparition de l'activité motrice chez l'embryon coïncide souvent avec la réponse aux stimuli sensoriels (Hamburger 1963, citant entre autres Angulo 1932 ; Bridgman et Carmichael 1935). Néanmoins, des travaux plus récents ont montré qu'un système moteur peut également se développer chez les mammifères sans influx sensoriels. Ces travaux seront discutés dans la section suivante.

Hamburger a observé que la motilité est caractérisée par de courtes périodes d'activité qui sont suivies de plus longues périodes d'inactivité, et que les durées d'activité et d'inactivité sont régulières. Ainsi, Hamburger, discute non seulement de la « spontanéité » de la motilité, soit la propriété « non-reflexogénique » de l'évènement, mais également de la rythmicité.

### **Central pattern generators (CPG)**

La rythmicité qui piquait la curiosité de Hamburger est devenue le noyau de plusieurs décennies de recherche. La nature rythmique du comportement témoignait de la rythmicité de l'activité neuronale sous-jacente. De plus, des enregistrements d'explants de structures cérébrales (de l'embryon du poulet) montraient une activité électrique rythmique (Cunningham et Rylander 1961). Ainsi, on se demandait comment est-ce que des neurones en circuit peuvent générer une activité rythmique, et comment ces circuits se développent-ils. On a défini un groupe de neurones générant une activité neuronale rythmique comme « central pattern generators » (CPG).

Cherchant à comprendre le fonctionnement d'un CPG, plusieurs chercheurs se sont penchés vers le ganglion stomatogastrique du homard (STG). Le STG contrôle la mastication ainsi que le transport de la nourriture à l'estomac du homard, et génère des activités rythmiques spécifiques à ces deux fonctions. La simplicité de la préparation, ainsi que la facilité de l'identification des neurones impliqués ont permis la découverte des composantes cellulaires et des composantes ioniques contribuant à l'activité rythmique.

Le CPG du STG se compose de 13 neurones. Ceux-ci sont identifiables par leurs positions, morphologies, projections, et neurotransmetteurs. Les connections entre les neurones sont de nature électrotoniques (via des jonctions gap) ou inhibitrices. Un noyau de 3 neurones, lorsqu'actif, inhibe les dix autres neurones du CPG. Ainsi, lorsque ce noyau est inactif, les 10 autres neurones deviennent actifs. La chronologie précise de l'activité de ces neurones permet le motif précis de contractions des muscles pyloriques. Le circuit a la capacité de fonctionner de façon autonome ou en réponse à des stimuli sensoriels, et peut-être modulé par plusieurs hormones, peptides etc (Selverton et Miller 1980). En somme, des cycles d'activation suivie d'inhibition entre les différents neurones assurent le fonctionnement du CPG.

Parallèlement, les CPG à la base de la locomotion a été examiné. La locomotion, sous ses différentes formes, est un comportement hautement rythmique qui a longtemps suscité l'intérêt des biologistes intéressés par les CPG. La neurophysiologie de la locomotion a été examinée chez plusieurs espèces, dont la lamproie d'eau douce (*Lampetra fluviatilis*) et de mer (*Petromyzon marinus*), vu la simplicité relative de la moelle épinière et l'accessibilité des neurones dans la préparation *in vitro* développé chez ces animaux. L'activité natatoire de la lamproie consiste d'ondulations latérales alternantes du corps issus de contractions musculaires se propageant de la tête au bout de la queue. Les segments de la moelle épinière sont capables de maintenir l'activité alternative de la nage. Un système de 3 types d'interneurones de chaque côté de la moelle épinière gère l'activité rythmique. Lors d'une contraction, un interneurone glutamatergique ayant un axone



ipsilatéral-descendant fait contact avec tous les autres types de neurones de ce côté de la moelle épinière, incluant les motoneurones qui déclenchent la contraction musculaire (Buchanan et Grillner 1987). Ensuite deux types d'interneurones inhibiteurs existent. Un interneurone inhibiteur commissural inhibe les neurones du côté contralatéral à la contraction. Puis, un interneurone inhibiteur ipsilatéral inhibe les neurones du côté ipsilatéral à la contraction, afin de mettre fin au plateau de contraction de ce côté (Buchanan 1982).

Une organisation semblable existe chez la xénope (*Xenopus laevis*). La larve au stade 34/37 nage en réponse aux stimuli tactiles (Roberts et al 1983). Les contractions de la nage se propagent de la tête au bout de la queue, et alternent d'un côté à l'autre. Le circuit du CPG qui génère l'activité neuronale de la nage est composé de quatre types de neurones actifs lors de la nage (Roberts, 2000). Tout d'abord, des interneurones projetant un axone descendant font des connexions excitatrices avec tous les autres types de neurones du côté ipsilatéral, avec co-libération de glutamate et d'acétylcholine (Li et al 2004). Les motoneurones, eux font une connexion électrique avec d'autres motoneurones, ainsi que cholinergiques avec les fibres musculaires (Perrins et Roberts 1995). Des interneurones glycinergiques commissuraux envoient leurs axones à l'autre côté de la moelle épinière afin d'inhiber les neurones contralatéraux à la contraction, contribuant ainsi à la coordination gauche-droite de la nage (Dale 1985). Ensuite, des interneurones ipsilatéraux glycinergiques assurent une inhibition ipsilatérale en retour à l'excitation du côté de la contraction (Li et al 2002).

Ainsi, plusieurs décennies de recherche suggèrent deux mécanismes pouvant mener à une activité rythmique oscillatoire : (1) une rythmogénèse actionnée par un groupe de cellules ayant des propriétés intrinsèques d'oscillations de potentiels membranaires (« pacemakers »), comme les cellules pacemakers cardiaque, le STG des crustacés, décrit plus haut, et différents réseaux corticaux (Selverston et Miller 1980) ou (2) par des mécanismes de réseau, où les dynamiques oscillatoires résultent d'une coopération entre les

connections excitatrices et inhibitrices des cellules dans le circuit. Dans ce cas, l'activité oscillatoire ne résulte pas de l'activité d'une cellule individuelle. Par exemple, les circuits neuronaux sous-jacents à la locomotion chez le rat (O'Donovan et al 1998). De plus, il est question plus récemment de circuits oscillatoire ayant une origine d'activité hybride, combinant des cellules pacemakers et des dynamiques de réseaux, comme le CPG respiratoire chez les mammifères (Ivanenko et al 2008 ; Rybak et al 2004). Dorénavant, ces différents mécanismes seront adressés comme CPG à pacemaker, CPG à dynamique de réseau, et CPG hybride.

Les travaux qui seront décrits dans cet œuvre auront pour but d'examiner le développement de l'activité motrice à l'aide de lésions et d'interventions pharmacologiques suivi d'enregistrements comportementaux. La régularité rythmique lente et l'indépendance d'influx sensorielles semblent suggérer que l'activité spontanée initiale serait actionnée par un CPG-pacemaker. Par ailleurs, l'activité oscillatoire de la nage semble être assurée par un circuit CPG à réseau dynamique, de même que pour la locomotion chez les mammifères (Buchanan 1996; O'Donovan et al 1998). Les étapes de la transition qui mènent à cette maturation du comportement demeurent peu connues. Examiner cette question nécessite un modèle animal ayant des comportements moteurs facilement observables.

### **Le poisson-zébré comme modèle animal**

L'embryon poisson-zébré (*Danio rerio*) est devenu un modèle intéressant pour étudier le développement de circuits moteurs (Fetcho 2007, Fetcho et Liu 1997). Des techniques d'enregistrements électrophysiologiques en « patch-clamp » de neurones d'embryons (Drapeau et al 1999), ainsi que des indicateurs calciques encodés génétiquement ont été développées, permettant une observation quantitative de l'activité neuronale. L'observation par vidéographie à haute-résolution des comportements embryonnaires stéréotypés permet une analyse globale et rapide des circuits sous-jacents à l'activité motrice.

Plusieurs outils génétiques existent chez le poisson-zébré. À ce jour, on compte plusieurs lignées transgéniques exprimant des marqueurs fluorescent comme la *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) et la *red fluorescent protein* (RFP) dans différentes populations restreintes de cellules, facilitant l'observation de la morphologie et de l'activité de populations de cellules d'intérêt par microscopie confocale. La suppression de l'expression d'un gène peut se faire à l'aide d'oligonucléotides antisens (Nasevicius et Ekker 2000) et des lignées mutantes (issues de mutagénèses chimiques). Ces derniers permettent la découverte de gènes dont la fonction était préalablement inconnue.

### **Développement de l'activité motrice chez l'embryon du poisson-zébré**

La motilité embryonnaire du poisson-zébré a d'abord été observée et rapportée en 1974 (Kimmel et al 1974). Dans cet article, les auteurs font une description sommaire de la réponse au toucher chez l'adulte, ainsi que de l'apparition de l'activité spontanée, de la réponse au toucher, et de la nage chez l'embryon du poisson-zébré. Ces comportements embryonnaires ont été caractérisés en détail environ vingt-cinq ans plus tard. Dès 17 hpf, l'embryon démontre une activité spontanée, qui se manifeste en contractions de la queue qui alternent d'un côté à l'autre de la moelle épinière. La fréquence des contractions atteint son maximum vers 19 hpf à 1 Hz. Par la suite, la fréquence des contractions diminue progressivement à 0.1 Hz. Chaque contraction se propage en direction céphalo-caudale, c'est-à-dire que la musculature d'un somite contracte avant le somite suivant (caudal).

Dès 21 hpf, l'embryon devient sensible aux stimuli tactiles. Lorsqu'on touche l'embryon à l'aide d'un forceps, il répond par une à 3 contractions alternantes successives, la première étant toujours contralatérale au stimulus. Finalement, à 28 hpf, l'embryon commence à nager, avec des contractions à haute fréquence et à basse amplitude, permettant la locomotion (Saint-Amant et Drapeau 1998). La fréquence de la nage est en moyenne de 8 Hz à 28 hpf, puis augmente jusqu'à 100 Hz à 48 hpf (Buss et Drapeau 2001).

Cette augmentation de la fréquence de nage lors du développement est également observée chez la xénope (Van Mier et al 1999).

### **Anatomie de la moelle épinière poisson-zébré**

La moelle épinière du poisson-zébré est composée de neurones sensoriels, d'interneurones et de motoneurones, avec une structuration portant des similarités à la fois à *Xenopus laevis* et aux vertébrés supérieurs. On y retrouve les neurones sensoriels à l'extrémité dorsale, et les motoneurones à l'extrémité ventrale. Latéralement, chaque côté de la moelle est l'image miroir de l'autre, et on y retrouve quelques neurones commissuraux excitateurs et inhibiteurs dont les axones croisent ce « miroir » (Roberts 2000).

Dès l'apparition de l'activité spontanée, on retrouve 6 types de neurones dans chaque somite. Les interneurones IC (*ipsilateral caudally projecting*), ainsi que les VeLD (*ventral lateral descending*) projettent chacun un axone descendant du côté ipsilatéral. Il est à noter que les IC ne se trouvent que dans les premiers 6 somites. Ensuite, les neurones commissuraux CoPA (*commisural primary ascending*) sont les seuls neurones à traverser à traverser la moelle épinière à ce stade de développement. Leur axone, une fois du côté contralatéral au corps cellulaire, projette en direction rostrale. Trois motoneurones primaires innervent déjà les muscles. Ils sont nommés en fonction de leur position relative dans l'axe céphalo-caudal du somite, soient les RoP, MiP et CaP (*Rostral Primary, Middle Primary, et Caudal Primary*, respectivement). Les cellules sensorielles Rohon-Beard se trouvent à être les plus dorsales de la moelle épinière. Il existe 2 à 3 de ces cellules par somite, et leurs axones parcourent le fascicule dorsolatéral. De plus, ils possèdent des neurites périphériques sortant de la moelle épinière et innervant la peau. Finalement, les neurones DoLA (*dorsal lateral ascending*) se trouvent à une position légèrement ventrale des Rohon-Beard (Bernhardt et al 1990). Lors de l'activité spontanée, seuls les neurones Rohon-Beard et DoLA ne sont pas actifs (Saint-Amant 2005).

Par la suite, après l'apparition de la réponse au toucher à 21 hpf, d'autres neurones sont ajoutés à la moelle épinière (Bernhardt et al 1990; Kuwada et al 1990). Une seconde population de neurones commissuraux, les CoSA, apparaît. Leur axone se dirige également en direction rostrale une fois du côté contralatéral au corps cellulaire, tout comme les CoPA. Une population de neurones commissuraux, les CoB, présente un axone qui bifurque une fois du côté contralatéral. Deux types de neurones ayant leurs axone du côté ipsilatéral à leur corps cellulaire apparaissent, les *Circumferential Ascending* (CiA), puis les *Circumferential Descending* (CiD). Un sous-groupe des CoSA ainsi que les CoB semblent être glycinergiques, alors que l'autre groupe de CoSA ainsi que les CiA et CiD semblent être glutamatergiques (Higashijima et al 2004a et b).

### **Caractéristiques du circuit neuronal sous-jacent aux activités motrices embryonnaires**

On ne connaît toujours pas avec certitude quels sont les neurones qui génèrent l'activité rythmique, c'est-à-dire les cellules du « pacemaker ». L'ablation de toute structure rostrale à la moelle épinière n'abolie pas l'activité spontanée, mais fait en sorte que la nage est impossible (Saint-Amant et Drapeau 1998).

Il a été découvert que les neurones de la moelle épinière montrant une activité rythmique semblent être connectés par des synapses électriques, et non des synapses chimiques. Des enregistrements doubles entre neurones ipsilatéraux ont révélés une sensibilité aux bloqueurs de jonctions gap ainsi qu'une insensibilité aux bloqueurs de récepteurs glutamatergiques (Saint-Amant et Drapeau 2000, Saint-Amant et Drapeau 2001).

Des synapses électriques, ou jonctions gap sont des canaux intercellulaires ayant des pores pouvant laisser passer des ions et quelques métabolites d'une cellule à l'autre. La propagation d'un signal électrique d'un neurone à l'autre se fait donc par échange d'ions. Ceci contraste énormément avec une synapse chimique, où il n'y a pas de contact entre les

neurones, et que la propagation d'un signal électrique se fait au moyen la libération d'un transmetteur, qui doit lui-même se lier aux récepteurs du neurone post-synaptique.

Des connections par synapses électriques ont été trouvées dans d'autres circuits du système nerveux central, tels le bulbe olfactif (Friedman et Strowbridge 2003, Weber et Ross 2003), l'hippocampe (Draguhn et al 1998), le neocortex (Blatow et al 2003), et entre les motoneurones de la moelle épinière des mammifères (Tresch et Kiehn 2000). Ce couplage électrique existe aussi entre les motoneurones chez la xénope (Grinnell 1966), le chat (Cullheim et al 1977), et le rat (Fulton et al 1980).

On peut considérer un circuit couplé par jonctions gap comme une grande cellule, puisque les jonctions gap assurent une continuité du cytoplasme entre les cellules. En effet, l'hyperpolarisation d'une cellule du circuit assure l'hyperpolarisation de toutes les cellules couplées. Le même phénomène s'applique pour une dépolarisation.

À 17 hpf, les neurones du côté ipsilatéral à la contraction subissent des dépolarisations périodiques (PD) rythmiques. Ces PD représentent l'activité neuronale à la base des contractions musculaires. À ce stade, les PD ont une durée de 300 à 500 millisecondes (ms). À 21h, l'embryon commence à répondre au toucher avec des contractions alternantes. Ce nouveau comportement suggère un changement physiologique, possiblement dû à l'intégration de neurones sensoriels au circuit moteur. De plus, en exposant l'embryon à des bloqueurs de récepteurs glutamatergiques, la réponse au toucher est abolie, et ce malgré que les contractions spontanées persistent (Saint-Amant 2006). Il est donc probable que l'intégration des cellules sensorielles au circuit moteur requiert des connexions glutamatergiques. La nage, quant à elle, semble être généré par un circuit semblable à celui décrit chez la lamproie et chez la xénope.

Les rôles que joue l'activité spontanée demeurent peu connus, de même que les changements qui se produisent dans le système nerveux central lors de sa maturation, permettant la transition d'une activité lente à une activité rapide. Nous savons que différentes fréquences d'influx transitoires de calcium lors du développement peuvent

contribuer à la différenciation neuronale, ainsi que le phénotype de neurotransmission (Gu et Spitzer 1995 ; Spitzer 1995). Il est présumé que le circuit neuronal de l'activité spontanée servirait d'échafaudage au circuit moteur (Saint-Amant et Drapeau 2001). Parallèlement, des raffinements synaptiques se produiraient, permettant les comportements plus complexes apparaissant plus tard lors du développement. Chez le poulet, le circuit moteur établi lors de la phase embryonnaire est réutilisé pendant toute la vie de l'animal pour différents comportements, incluant la marche (Bekoff 1992), supportant ainsi l'hypothèse que le circuit précoce servirait d'échafaudage neuronal, auquel s'ajouterait différents composants modulateurs.

### **Fonctionnement d'un circuit neuronal CPG intrinsèque**

L'activité rythmique peut être générée selon les deux modes décrits plus haut : soit un circuit dépendant de cellules pacemakers ayant des propriétés oscillatoires intrinsèque ; soit un système oscillatoire de réseau, dépendant de propriétés excitatrices et inhibitrices des connections synaptiques. Un circuit neuronal composé de pacemakers, comme le CPG du ganglion stomatogastrique chez les crustacés, contient un groupe de cellules qui génèrent une activité oscillatoire qui dirige l'activité du circuit. Malgré que plusieurs connections synaptiques existent, et qu'il y a des influx modulateurs provenant de l'extérieur du ganglion, ce sont deux cellules spécifiques qui dirige l'activité dans le STG. Des enregistrements électrophysiologiques ainsi que des ablations de cellules ont montré que l'activité résultante du CPG dépend donc de ces oscillations endogènes des deux cellules dirigeantes, ainsi que des propriétés membranaires non-linéaires des cellules non-pacemaker connectées (Selverston et Miller 1980). L'exposition de ce CPG à la picrotoxine, qui bloque les récepteurs GABAergiques, perturbe le fonctionnement du circuit, dû à l'existence de synapses GABAergiques, cependant l'activité intrinsèque des cellules générant le rythme n'est que peu modifiée (Bidaut 1980).

Chez le poisson-zébré, les enregistrements de neurones actifs lors de l'activité spontanée ont démontrés les PD correspondent à l'activité neuronale à la base des contractions spontanées. Cette activité semble être dépendante à l'activité ionique des neurones, puisque le blocage de synapses chimiques n'affecte pas l'activité. Il est présumé que la dépolarisation initiale du PD est assurée par des canaux sodiques et calciques voltage-dépendant. D'autres canaux calciques maintiennent ce plateau de dépolarisation. Ensuite, le PD se termine avec une hyperpolarisation assurée probablement par des canaux potassiques voltage-dépendants ( $K_V$ ) ainsi qu'activés par le calcium ( $K_{Ca}$ ). Cette hyperpolarisation soudaine, mettant fin au PD, est suivi d'une rampe de dépolarisation, avant le déclenchement soudain d'un autre PD (Saint-Amant et Drapeau 2000, Saint-Amant et Drapeau 2001).

### **Fonctionnement d'un circuit neuronal CPG à dynamiques de réseaux**

Les circuits neuronaux oscillatoires, tel ceux sous-jacents à la nage chez la lamproie et chez la xénope, dépendent plutôt de dynamiques synaptiques, plutôt que de la rythmogénèse endogène d'un groupe de cellules. Deux composantes vraisemblablement essentielles à cet activité sont, d'une part, la nature majoritairement excitatrices des connexions dans la moelle épinière, et d'autre part, la présence d'une dépression prolongée d'excitabilité du circuit (O'Donovan et Chub 1997).

Premièrement, la nature excitatrice du circuit embryonnaire reflète non seulement l'importance des connexions glutamatergiques, mais également l'action excitatrice des neurotransmetteurs inhibiteurs classiques, soient l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine (Obata et al 1978 ; Nishimaru et al 1996). L'ouverture des canaux chloriques due au GABA se liant à son récepteur provoque une sortie de chlorure, dépolarisant ainsi la cellule (Rohrbough et Spitzer 1996), puisqu'aux stades embryonnaires, la concentration intracellulaire de chlorure est supérieure à sa concentration extracellulaire. Cette dépolarisation peut être inhibitrice, puisque le potentiel d'inversion du chlorure, à ce stade,



se trouve sous le seuil de potentiel d'action. Ainsi, une dépolarisation causée par l'ouverture de canaux de chlorure maintient la cellule sous le seuil de déclenchement de potentiel d'action. Toutefois, chez le rat, la dépolarisation due au GABA peut suffire à l'ouverture de canaux calciques et sodiques générant l'épisode d'activité (Ben-Ari 2001).

Deuxièmement, les périodes de dépression du circuit correspondent aux périodes d'inactivité, entre les contractions individuelles. Chez l'embryon du poulet, cette dépression semble être régulée par le GABA. L'application de bicuculline peut avoir un impact sur la fréquence des événements (Chub et O'Donovan 1995). Ainsi, une dépression temporaire du GABA peut contribuer à la dépression du circuit, possiblement dû à un excès de GABA extracellulaire (O'Donovan et al 1998), ou à l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium, qui peut inhiber les récepteurs GABAergiques (De Koninck et Mody 1996).

Chez le poisson-zébré, l'activité glutamatergique est nécessaire pour la nage et la réponse au toucher. Toutefois, il ne semble pas y avoir une influence importante du GABA lors de la phase embryonnaire (Saint-Amant et Drapeau, 2000 ; Higashijima et al 2004). Une activité synaptique impliquant la glycine, le neurotransmetteur inhibiteur prépondérant chez l'embryon du poisson-zébré, est présente lors de l'activité spontanée, mais seulement à partir de 20 hpf, soit 3 heures après l'apparition de l'activité spontanée. De plus, le blocage de cette composante synaptique, ainsi que le blocage de récepteurs glutamatergiques ne semble pas affecter les PD sous-jacents à l'activité spontanée (Saint-Amant et Drapeau 2000). Cette activité glycinergique, tout comme l'activité glutamatergiques, semble plutôt être importante pour la réponse au toucher et pour la nage (Cui et al 2005; Hirata et al 2005).

Un circuit neuronal oscillatoire à dynamique de réseau permet une plus grande flexibilité de l'activité générée, quoique nécessitant un plus grand substrat neuronal. Ceci rend donc possible le spectre de comportements moteurs plus matures, incluant les diverses

vitesses de nage, les changements de directions, la poursuite d'une proie ou la fuite d'un prédateur (Saint-Amant 2006).

Ainsi, il est possible que chez l'embryon du poisson-zébré, l'activité spontanée dépend d'un CPG pacemaker, puis que la nage dépend d'un CPG à dynamique de réseau. Le moyen par lequel cette maturation se fait d'un mode de fonctionnement à l'autre demeure inconnu. Dans les chapitres suivant, je décrirai d'abord un projet de recherche impliquant un mutant qui ne répond pas aux stimuli tactiles, mais dont les autres fonctions du circuit moteur semblent intactes. À l'aide de ce mutant, l'activité spontanée peut être analysée en absence de la composante sensorielle dans le circuit moteur embryonnaire.

Ensuite, nous avons établi le circuit neuronal minimal nécessaire à la réponse au toucher au moyen de lésions de la moelle épinière suivi d'enregistrements d'activité motrice. La partie rostrale de la moelle épinière, et non le rhombencéphale, a été démontré comme étant nécessaire à la réponse au toucher (en plus de l'activité spontanée), ainsi que l'activité glutamatergique via les récepteurs AMPA. Enfin, une évaluation du groupement temporel des contractions ainsi qu'une caractérisation pharmacologique nous a permis de découvrir un comportement transitoire lors de la maturation de l'embryon avant l'apparition de la nage. Ce comportement, dépendant du glutamate, supporte notre hypothèse que le CPG se développe d'un circuit dépendant de pacemakers endogènes jusqu'à un circuit oscillatoire à dynamique de réseau, impliquant des connections synaptiques chimiques permettant la nage et la diversité comportementale conséquente.

## Matériel et méthodes

### Elevage et entretien des poissons

Les poisson-zébrés (*Danio rerio*) adultes de plusieurs souches sauvages (AB, Tübingen) ainsi que les souches mutantes (*touché*) et transgéniques (Alx::eGFP, Tub::eGFP, SSX-mini-ICP:eGFP) ont été maintenus dans des aquarium à eau douce filtrée maintenue à 28° Celsius, selon les protocoles recommandés par The Zebrafish Book (Westerfield, 1999), et conformément aux normes de Code de déontologie des études sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal.

### Marquage par anticorps fluorescents

Le marquage par anticorps fluorescents s'est fait sur des embryons de la lignée transgénique SSX-ICP::eGFP entiers traités avec 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU) afin de réduire la formation de mélanophores, c'est-à-dire les cellules pigmentaires, fixés à 48 hpf pendant 30 min à température ambiante dans 4% paraformaldehyde en solution dans du PBS. Les embryons fixés ont été lavés 3 fois dans du PBS puis traités à la collagénase 1 mg/ml pendant 10 minutes. Ensuite, les embryons ont été rincés d'abord avec du PBS, puis avec du PBST (PBS enrichi du détergent Triton X-100 à 0.1%), puis avec du PBST avec 2 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA), puis avec du PBST avec 2 mg/ml BSA et 1% de sérum de mouton inactivé. Les embryons ont ensuite incubés à 4° C pendant la nuit avec l'anticorps primaire anti-eGFP IgG de lapin (Torrey Pines Biolabs), dilué 1:2000 dans la solution PBST, avec BSA, et sérum de mouton inactivé. Le lendemain, les embryons ont été rincés avec du PBST 3 fois, puis avec le PBST avec BSA, puis le PBST avec BSA et sérum de mouton inactivé. Les embryons ont ensuite baigné dans une dilution 1:2000 de l'anticorps secondaire de souris anti-lapin, conjugués avec le fluorophore Alexa-467, pendant 4 à 6 heures à température ambiante. Les embryons ont ensuite été rincés 5 fois

dans du PBST, ensuite 5 fois dans du PBS, puis incubés pendant 30 minutes dans du glycérol à 70% (dans du PBS), avant d'être montés dans du glycérol à 70% sur des lames de microscope, puis imagés par microscopie confocale.

### **Microinjections**

Les microinjections ont eu lieu aux heures de développement indiquées. Lorsque les embryons étaient d'au moins 17 hpf, ils étaient anesthésiés dans une solution de Tricaine (MS-222, Sigma), puis immobilisés dans une solution 0.6% d'agarose à basse température de fonte. Les drogues étaient dilués dans une solution physiologique Evans (NaCl 134 mM, KCl 2.9 mM, CaCl 1.6 mM, MgCl 1.2 mM et HEPES 10 mM), avec 0.3% de colorant Fast Green (Sigma-Aldrich) et 6% Fluorescein Isothiocyanate, afin d'observer la diffusion sous lumière fluorescente. Comme témoins, le même volume d'eau distillée remplaçait la drogue. Un bolus du mélange eau/droque, Evans, Fast Green et Fluorescein Isothiocyanate a été injecté au niveau de la tête des embryons.

### **Pharmacologie**

Les drogues injectées étaient à forte dose, de sorte à assurer une fonction saturante. (Tocris), CNQX (Tocris) et APV (Sigma) co-injectés, apamin (Tocris), omega-agatoxin IVA (Tocris), omega-conotoxin GVIA (Tocris). Les expositions à la (Sigma), la nifedipine (Sigma), la strychnine (Sigma) ont eu lieu sans injection, c'est-à-dire par diffusion "dans le bain".

### **Analyses comportementales**

Des embryons vivants ont été filmés soit partiellement immobilisés dans de l'agarose 1%, ou soit libre dans l'eau, selon l'expérience.

Des vidéos ont été capturées à 15 Hz ou 30 Hz selon le comportement observé, en fonction la résolution temporelle désirée, à l'aide de la caméra digitale Flea 2 (Point Grey Research) ainsi que le logiciel d'acquisition FlyCap2 du même fabricant. L'acquisition pouvait se faire à l'aide de la caméra montée sur un microscope à dissection Olympus MODEL afin d'obtenir un meilleur grossissement. Par la suite, les données des vidéos étaient extraites à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) avec le « plugin » Manual Tracker (NIH), permettant la capture d'information en cliquant sur la vidéo avec la souris. À chaque clique, le temps et les coordonnées du pointeur étaient enregistrés. Ainsi, en passant image par image à travers la vidéo, on pouvait cliquer sur un poisson à chaque contraction, ou à chaque début et fin de contraction. Les données étaient ensuite transférées à Excel (Microsoft) pour l'analyse, afin de trouver la fréquence de contraction, la distribution des intervalles entre les contractions, la durée des contractions, etc.

### **Dissociation et culture cellulaire et imagerie calcique**

La dissociation cellulaire a été exécutée en suivant les protocoles décrits préalablement (Westerfield 199x, Andersen 2001). De 20 à 30 embryons de lignées WT, *Alx::GFP*, *Tub::GFP*, ou *Tub::GFP* ont été anesthésiés vers 20 hpf, puis stérilisés environ 5 secondes dans 70% EtOH, ensuite rincés dans une solution Evans, enrichi d'antibiotiques (Penicilline, Streptomycine). Les embryons ont ensuite été transférés dans un microtube avec 1 ml de PBS, 10 mM EDTA, 0.02% pen-strep et 0.25% Trypsin, puis incubés à 28.5°C pour environ 15 minutes, avec 2 à 3 triturations à l'aide d'un pipeteur 200 µl. Une fois dissociées, les cellules ont été centrifugées à 300g pour 2 minutes, rincées dans un milieu L-15, centrifugées de nouveau, puis suspendues dans 500 µl de milieu L-15 enrichi de 0.8 µM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% pen-strep, et 3% sérum bovin fœtale (FBS). Une goutte de 250 µl fut déposée au milieu d'un pètri à culture cellulaire Easy-Grip (Falcon) de 60 mm, puis incubée à 28.5°C pour 5 à 6 heures permettant l'adhésion des cellules. Ensuite, les plats étaient inondés de milieu L-15 enrichi.

Pour l'imagerie calcique, le milieu L-15 a été rincé et remplacé par une solution Evans enrichi de 0.02% pen-strep et de 2% FBS. Les cellules ont ensuite été incubées 30 min dans 0.001% d'indicateur calcique Rhod-2 AM (Molecular Probes) dans le Evans enrichi à température ambiante, puis rincées de nouveau dans le Evans enrichi.

Un laser Argon de 568 nm a été utilisé à environ 65% de sa puissance totale pour enregistrer les influx transitoires de calcium à l'aide du logiciel Volocity (PerkinElmer), avec le microscope Olympus BX61W1 équipé d'un système confocal « spinning disc » (Quorum WaveX Technologies Inc., Guelph, Canada). Les images ont été acquises à une fréquence de 4 à 10 Hz.

Les données ont été extraites à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) en traçant des régions d'intérêt conformes au périmètre de cellules démontrant ou non des influx calciques, et en mesurant l'intensité moyenne de la fluorescence dans chaque image dans ces régions. Ces intensités moyennes ont ensuite été converties en variation d'intensité relative au niveau au basal d'intensité de la cellule. Ce niveau basal a été déterminé par la moyenne de 10 images consécutives précédant ou suivant un influx calcique (s'il y a lieu).

## **Chapitre 1 Analyses comportementales du mutant *touché* ainsi que la morphologie générale des cellules sensorielles Rohon-Beard (Low et al 2010)**

Les résultats présentés dans les figures 1 à 4 de ce chapitre ont été obtenus dans le cadre d'un projet de recherche publié dans Journal of Neuroscience en juillet 2010, intitulé :

*touché* is required for touch-evoked generator potentials within vertebrate sensory neurons

Dans cet article, un mutant insensible au toucher est décrit, d'abord par une analyse comportementale, suivi d'une analyse morphologique des neurones sensoriels Rohon-Beard. Enfin, une étude électrophysiologique de ces mutants a révélé l'existence de deux populations de neurones sensoriels chez l'embryon du poisson-zébré, ayant différentes propriétés de courants en réponse aux stimuli tactiles.

Ma contribution à cet article se résume à l'analyse comportementale, ainsi que l'immunohistochimie des neurones sensoriels Rohon-Beard, chez les embryons mutants (figures 1 à 4). La figure 5 présente à des résultats non-publiés, mais pertinents à l'étude de la maturation du CPG.

## Introduction

Il est présumé que le développement du circuit neuronal moteur du poisson-zébré se produit par l'ajout de neurones actifs au circuit, et par le raffinement de connections permettant un plus fin contrôle du mouvement. L'activité spontanée qui apparaît à 17 hpf atteint une fréquence maximale vers 19 hpf. Ensuite, la fréquence diminue progressivement jusqu'à l'apparition de la nage. À ce point, les épisodes de nage sont de courtes durées, et suivis de longues périodes d'inactivité, alors que les contractions individuelles à grande amplitude typiques de l'activité spontanée sont presque disparues. De plus, la nage dépend d'excitation glutamatergique et d'influx à partir du rhombencéphale (Saint-Amant et Drapeau 1998).

La réponse au toucher débute après l'apparition de l'activité spontanée, mais avant l'apparition de la nage. Quoique ce comportement est souvent associé à la stimulation tactile de l'embryon par l'observateur, il est possible que d'autres facteurs tactiles environnementaux induisent des réponses au toucher chez l'embryon. Il est également possible que l'embryon induit lui-même une réponse au toucher, par exemple, lorsque le bout de la queue touche à la tête lors d'une contraction. L'influence de cette réponse sensorielle sur la maturation du circuit moteur est inconnue. Afin de déterminer si la réponse au toucher influence le circuit moteur, il faut bloquer la composante sensorielle lors de son apparition, puis observer le comportement moteur qui en résulte. En bloquant les récepteurs glutamatergiques de type AMPA chez des embryons du poisson-zébré, on abolie la réponse au toucher (Saint-Amant 2006). Toutefois, l'effet de ce blocage affecte toutes les composantes glutamatergique-AMPA du système nerveux. Ceci rend difficile l'interprétation de résultats comme étant propre ou non à l'abolissement de réponse au toucher.

Ainsi, il fallait un moyen de réduire au silence la composante sensorielle dans le circuit moteur, tout en laissant le reste du système nerveux intact. Nous avons donc utilisé



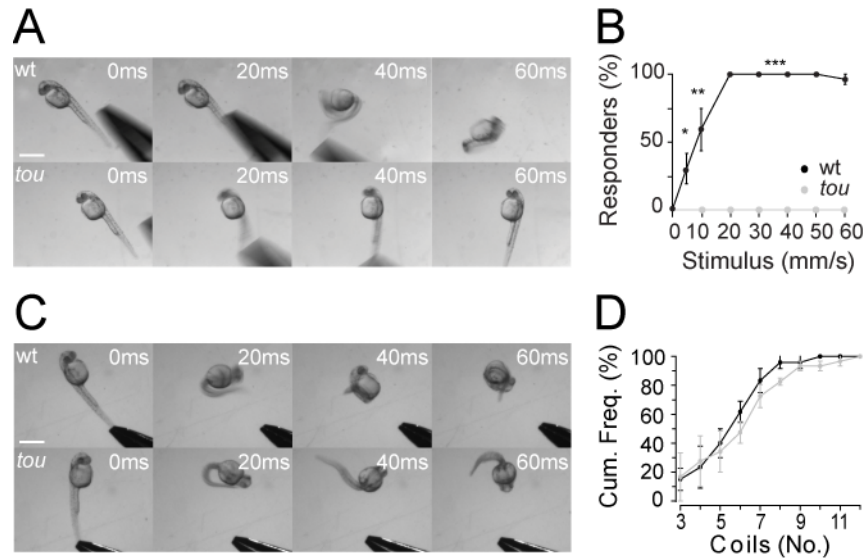
le mutant *touché* afin d'explorer l'activité spontanée. J'ai participé à la description de ce mutant en faisant l'analyse comportementale, ainsi qu'une analyse immunohistochimique des neurones sensoriels.

Lors d'une mutagénèse ayant eu lieu au Michigan, États-Unis, quelques mutants présentant des phénotypes d'anomalies d'activité motrice embryonnaire ont été découverts (Cui et al 2005, Hirata et al 2005). L'un de ces mutants, nommé *touché*, ne répond pas au toucher léger tout au long de son développement, mais répond à une stimulation tactile forte, dite nociceptive, suggérant un défaut de mécanosensation. Les neurones qu'on croit responsables de la mécanosensation sont les cellules Rohon-Beard, situées tout au long de la partie la plus dorsale de la moelle épinière, et ayant des projections périphériques qui innervent la peau.

Une incapacité de répondre à une stimulation tactile pourrait être due à un défaut n'importe où dans le circuit neuronal sous-jacent à la réponse au toucher. Nous avons donc testé différents paramètres nous permettant de déterminer si les circuits neuronaux de la moelle épinière étaient fonctionnels dans le mutant *touché*. L'hypothèse est qu'une mutation causant un défaut de la détection d'un stimulus tactile à la peau ne devrait pas altérer le fonctionnement normal du système nerveux autre que cette réponse au toucher.

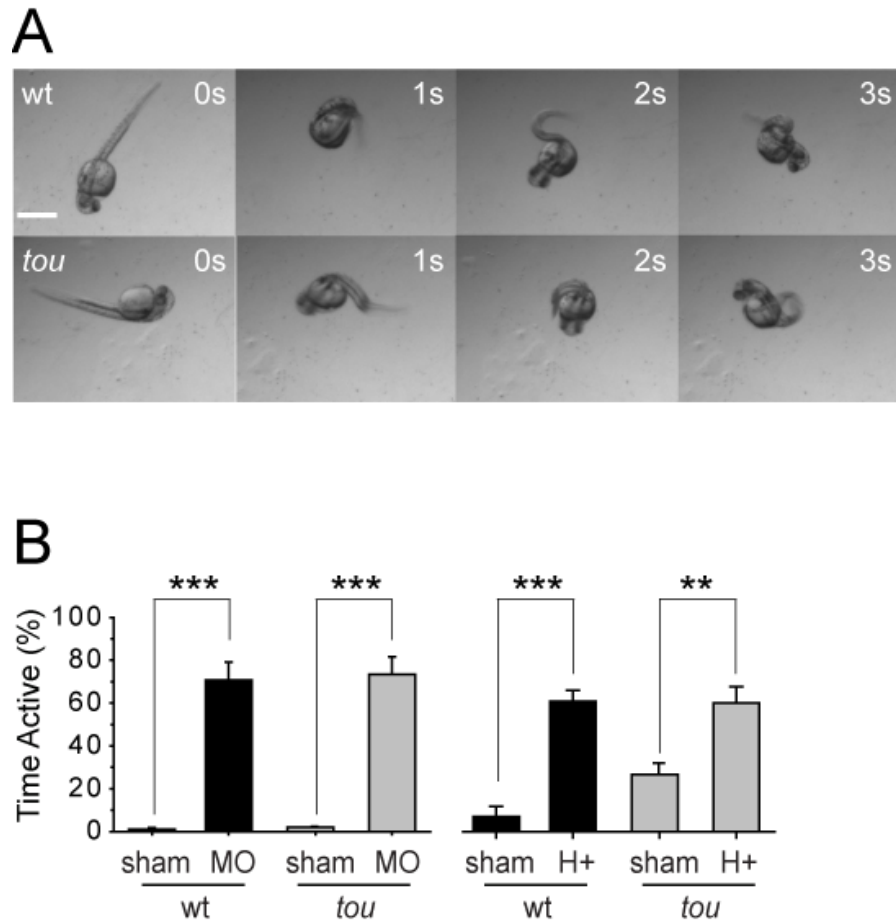
## Résultats

L'embryon de type sauvage répond différemment à un toucher léger qu'à un toucher plus fort (par exemple, un pincement de la queue). Ainsi, la Figure 1 montre que le mutant ne répondait pas au toucher léger, montré sous forme de pourcentage du nombre d'embryons d'une ponte qui répondaient au toucher à différentes vitesses de frappe à l'aide de pinces. Toutefois, la figure 1B montre qu'un pincement à la queue, soit un stimulus tactile fort, évoquait une réponse de plusieurs contractions autant chez les mutants que chez les embryons WT.



**Figure 1.** (tirée Low et al 2010, Figure 1) Figure 1: Touché mutants fail to respond to light-touch, but respond to tail-pinching. (A) Time-lapse images of responses to tactile stimuli applied to the tail of a 26 hours post-fertilization (hpf) embryos. Scale bar here and below 500 $\mu$ m. (B) Correlation of tactile stimuli speed and the percentage of responsive wild type and touché mutant embryos (Each speed n = 15 embryos from 3 clutches). Values here and in subsequent figures represent the average  $\pm$  SEM. P values here and in subsequent figures are as follows \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. (C) Pinching of the caudal fin (nociceptive tail-pinching) evoked coiling in both wild type and touché mutants. (D) Cumulative frequency of the number of coils performed in response to tail-pinch (n = 15 embryos from 3 clutches).

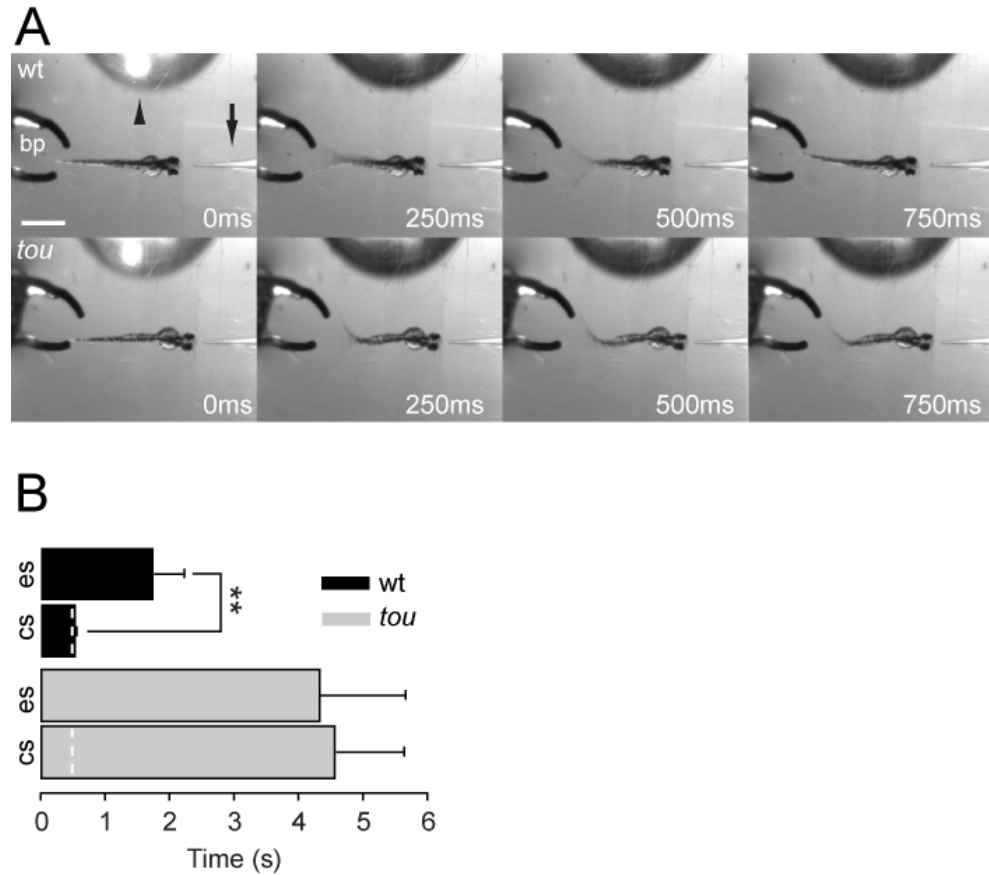
Ayant démontré l'incapacité du mutant à répondre au toucher, il fallait ensuite tester d'autres fonctions du système nerveux afin de s'assurer que la mutation n'affecte que la mécanosensation. La capacité des embryons à répondre à des stimuli nocifs non-tactiles a donc été testée en déposant les embryons un à un dans un bain d'eau avec 500  $\mu$ M d'allyl-isothiocyanate, ou « mustard oil ». Cet agent, qui active les canaux TRP (Transient Receptor Potential), l'embryon à produire des contractions de fuite. La figure 2 démontre que les mutants répondaient de la même façon que les WT à ce stimulus nocif, c'est-à-dire que le pourcentage de temps actif lors des 10 premières secondes d'une exposition à l'allyl-isothiocyanate était identique.



**Figure 2.** (tirée de Low et al 2010, Figure 2) Touché mutants respond normally to noxious stimuli. (A) Time-lapse images of wild type and touché mutants in the presence of mustard oil (500 $\mu$ M) respond with increased motor activity at 26 hpf. Scale bar 500 $\mu$ m. (B) Analysis of percent time active within the first 10s of exposure to mustard oil (MO; n = 28 embryos from 3 clutches), and within 10s following 1min of exposure to low pH (H+; n = 15 embryos from 3 clutches; images not shown) compared to sham controls for mustard oil (1% DMSO) and low pH (Evans pH 7.5), respectively.

L'expérience suivante testait deux paramètres du fonctionnement de la moelle épinière. D'une part, à l'aide d'un choc électrique administré à la queue, on observe si le circuit neuronal permet de générer la nage, c'est-à-dire des contractions de basse amplitude alternant à haute fréquence. Par ailleurs, chez les WT, un toucher léger peut déclencher la nage, mais elle peut aussi l'arrêter. Lorsque les embryons nagent dans un bain, ils cessent de nager lorsqu'ils entrent en contact avec la paroi du bain, ou avec un autre embryon. Ainsi, nous avons restreint des embryons dans un bloc d'agarose à 1%, laissant la queue libre, et exposant la tête. Une électrode bipolaire placée au bout de la queue administrait un choc électrique déclenchant la nage, puis, 500 ms plus tard, un jet d'eau en direction de la tête simulait un toucher.

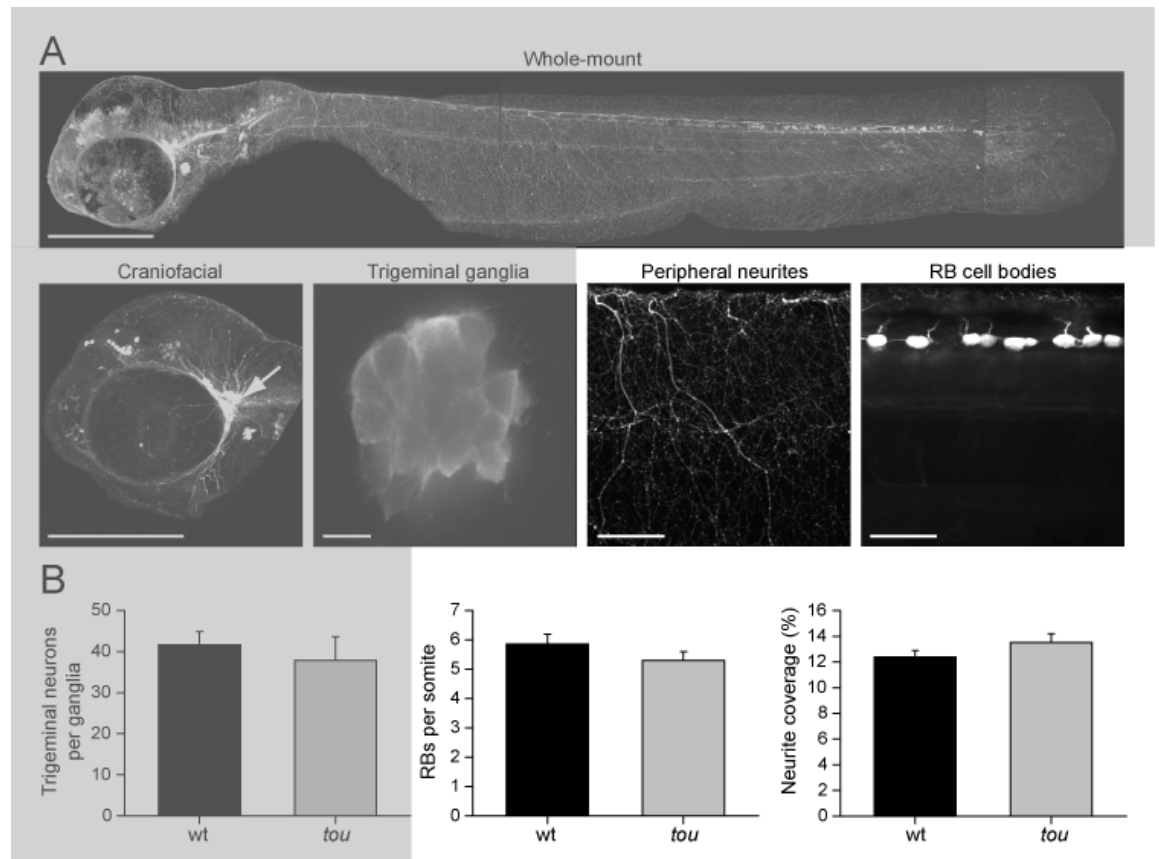
À la figure 3, on voit que dans tous les cas, un choc électrique à la queue a déclenché un épisode de nage chez les embryons mutants et WT. Cependant, le jet d'eau à la tête mettait fin à l'épisode de nage seulement chez les WT. Il est intéressant de noter que les mutants nageaient beaucoup plus longtemps que les embryons WT. Ceci s'explique possiblement par la déficience de la composante sensorielle tactile qui peut mettre fin à la nage.



**Figure 3.** (tirée de Low et al 2010, Figure 3) Touché mutants lack a stopping response. (A) Time-lapse images of wild type and touché mutants at 48-52hpf during electrically-evoked swimming trials wherein the counter stimulus was applied. The electrical stimulus delivered by a bipolar probe (bp) was paired with an LED arrowhead) visible within the field of view. The counter stimulus, waterjet (arrow), was applied 500ms following the touché is required for responsiveness to touch electrical stimulus. Scale bar 500 $\mu$ m. (B) Time spent swimming following the electrical stimulus alone (es), or following the counter stimulus (cs). The counter stimulus is indicated as a dashed line (n = 10 larvae for each from 3 clutches).

Ces résultats comportementaux suggèrent que globalement, la moelle épinière est capable de générer l'activité neuronale nécessaire aux contractions et à la nage en réponse à plusieurs stimuli, mais pas au stimulus tactile léger. De plus, cette déficience est davantage soulignée par l'incapacité de cesser un épisode de nage en réponse au toucher, suggérant que le mutant possède une déficience spécifique aux neurones sensoriels. Ces résultats rappellent des thèmes récurrents d'intégration sensorielle au circuit moteur : les composantes sensorielles ne semblent pas nécessaires au fonctionnement normal du circuit moteur, mais peuvent le modifier ou l'arrêter en action.

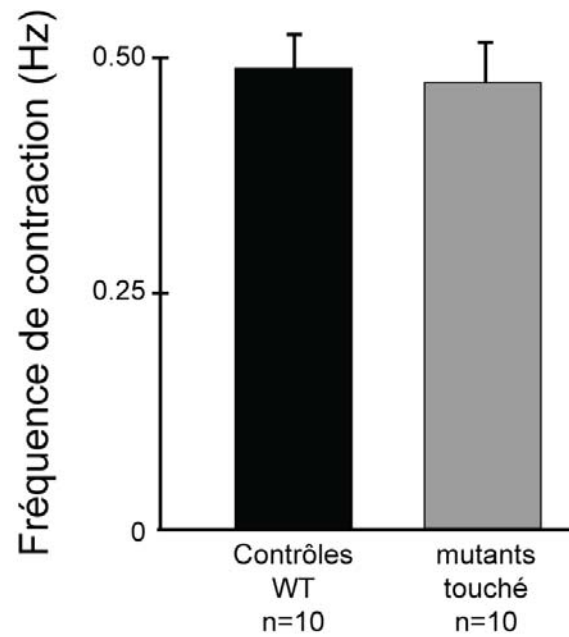
Par la suite, nous devons vérifier si les neurones sensoriels étaient présents et fonctionnels. Nous avons donc analysé la morphologie générale de ces neurones sensoriels, les Rohon-Beard. À l'aide de la lignée transgénique SSX-ICP::eGFP, exprimant la eGFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux neurones sensoriels Rohon-Beard, nous avons pu quantifier le nombre de ces cellules par somites (Figure 4), ainsi que le degré d'innervation, en mesurant le pourcentage de pixels ayant une intensité dû à la fluorescence. Par ces deux paramètres, les mutants *touché* et les WT se trouvaient à avoir un nombre semblable de cellules sensoriels Rohon-Beard, ainsi qu'une innervation de la peau semblable.



**Figure 4.** (tirée de Low et al 2010, Figure 5) Gross morphology of sensory neurons in touché mutants appears normal. (A) Whole-mount labeling of eGFP positive sensory neurons from a touché mutant larvae at 52 hpf. Scale bar 200µm. (B) Craniofacial labeling with trigeminal ganglia highlighted (arrow), scale bar 200µm. Trigeminal ganglia, scale bar 10µm. Peripheral neurites, scale bar 50µm. RB cell bodies, scale bar 50µm. (C) Average trigeminal neurons per ganglia, RBs per somite and coverage of skin by peripheral neurites (n = 9 for each from 3 clutches).



Les résultats présentés jusqu'à maintenant suggèrent que le mutant touché a un défaut au niveau de la mécanosensation, mais que les autres fonctions du système nerveux semblent intactes. Donc, afin de déterminer si l'apparition de la réponse au toucher influe sur l'activité du circuit moteur, nous avons donc procédé à l'analyse de l'activité spontanée du mutant *touché*. La fréquence moyenne des contractions a été mesurée chez des embryons *touché* mutants à 24 hpf, soit quatre heures après l'apparition de la réponse au toucher, et alors que l'activité spontanée était encore présente (Figure 5). Tel que prévu, la fréquence des contractions spontanée des mutants n'était pas différente des embryons témoins.



**Figure 5** (Résultats non publiés) Fréquence de contractions spontanées moyenne d'embryons de type sauvage (WT) et de type mutant *touché*. Des embryons de chaque type ont été filmés à 10 images par seconde, puis les contractions comptées sur une période de 2 minutes. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type dans chaque groupe.

## **Discussion**

Les embryons mutants examinés ci-haut ne répondent pas à un stimulus tactile léger. Cependant, les analyses comportementales subséquentes démontrent que ces mutants sont capables de répondre à d'autres stimuli nocifs par des contractions vigoureuses, et qu'ils sont capables de nager. De plus, les neurones sensoriels Rohon-Beard ainsi que leur innervation semblent morphologiquement intacte. Ainsi, ces résultats suggèrent que le système nerveux des mutants se développe normalement sans influx sensoriels.

Puisque l'activité spontanée ne semble pas être différente chez les embryons mutants, il semblerait que la maturation du CPG moteur ne soit pas influencée par la réponse au toucher, même si le système sensoriel recrute ce circuit moteur. Ce résultat est en accord avec des études chez l'embryon du poulet (Hamburger 1963).

## **Chapitre 2 Localisation anatomique du circuit neuronal minimal pour la réponse au toucher et l'activité spontanée**

Les résultats présentés à la figure 6 constituent ma contribution à un article publié en collaboration avec le laboratoire Philip Washbourne (University of Oregon) dans le journal *Developmental Neurobiology* en octobre 2009, intitulé :

Glutamate drives the touch response through a rostral loop in the spinal cord of zebrafish embryos.

Les figure 7 et 8 présentent des résultats non-publiés, pertinents à l'étude de la maturation du CPG.

## Introduction

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Washbourne en Oregon, nous cherchions à trouver le circuit neuronal sous-jacent à la réponse au toucher. Ceci permettrait d'étudier ensuite le développement du système neuronal sensoriel, et comment celui-ci s'intègre au circuit moteur. Pour ce faire, il faut d'abord trouver les régions anatomiques minimales nécessaires à la réponse au toucher. Nous savions que l'ablation du rhombencéphale abolissait la nage, mais pas l'activité spontanée (Saint-Amant et Drapeau 1998). Quant à la réponse au toucher, la nécessité du rhombencéphale était disputée (Saint-Amant et Drapeau 1998, Liu et Fetcho 1999).

Nous avons établi que le circuit minimal nécessaire pour la réponse au toucher pouvait correspondre à l'une des trois situations suivantes. Premièrement, il se peut que la réponse au toucher nécessite un circuit incluant des cellules du rhombencéphale, la partie la plus caudale du cerveau faisant contact avec la moelle épinière, et donc qu'une lésion laissant la moelle épinière déconnectée du cerveau éliminerait toute réponse au toucher.

Deuxièmement, il serait possible que chaque somite possède le circuit minimal pour générer une réponse motrice à une stimulation tactile, et donc, qu'une lésion à n'importe quel niveau de la moelle épinière laisserait un fragment répondant au toucher. Cette hypothèse suggère que puisque chaque somite contient des cellules sensorielles, des interneurons commissuraux glutamatergiques ainsi que des motoneurons, chaque somite posséderait le circuit minimal requis pour générer la réponse au toucher.

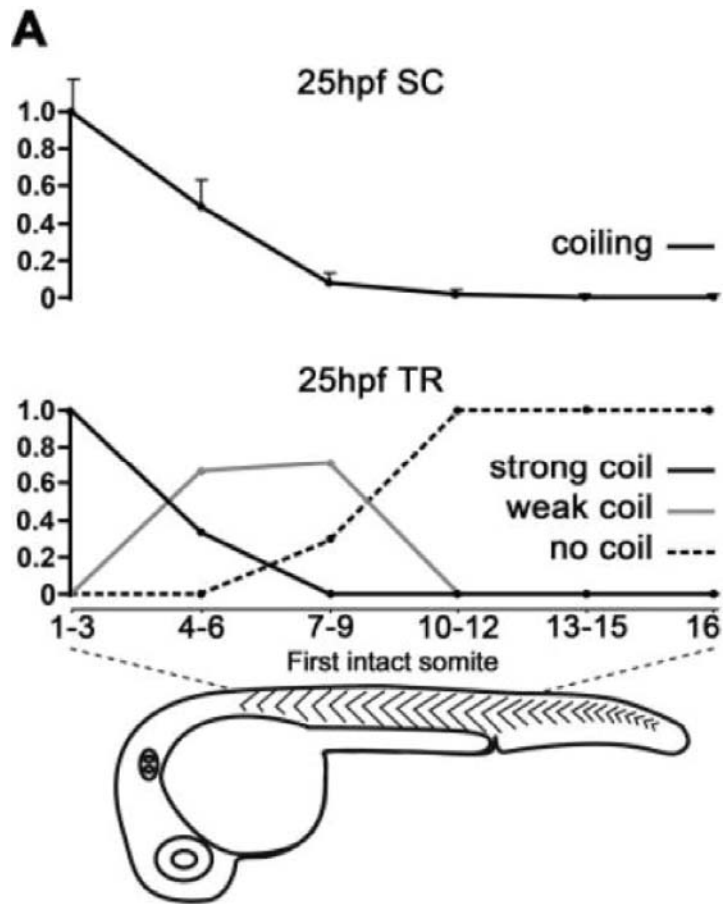
Troisièmement, il serait possible que le cerveau ne soit pas nécessaire, mais que le circuit requiert des neurones existants dans la partie rostrale de la moelle épinière. En effet, les neurones glutamatergiques descendants IC existent uniquement dans les 6 premiers somites de l'animal. Ainsi, la troisième hypothèse suggère que la moelle épinière serait

capable de générer l'activité neuronale à la base de la réponse au toucher tant qu'elle que ces somites rostraux soient présents. Une approche impliquant des lésions précises à la moelle épinière permettrait de déterminer quelle hypothèse est correcte.

## **Résultats**

Afin de déterminer la localisation du circuit neuronal minimal d'un point de vue anatomique, des lésions ont été effectuées au niveau de la moelle épinière, suivies d'analyses comportementales portant sur la réponse au toucher. Ces lésions, à différents niveaux de la moelle épinière, permettaient d'identifier quelle hypothèse était juste.

Les résultats nous indiquent qu'une lésion dans les 3 premiers somites n'affecte pas la réponse au toucher (Figure 6, tirée de Pietri et al 2010). Lorsque la lésion se situe dans les quatre somites suivants, on observe une perte significative de la proportion de spécimens qui répondent au toucher. Finalement, lorsqu'une lésion se situe à partir du somite 8 et plus caudalement, la réponse au toucher abolie.



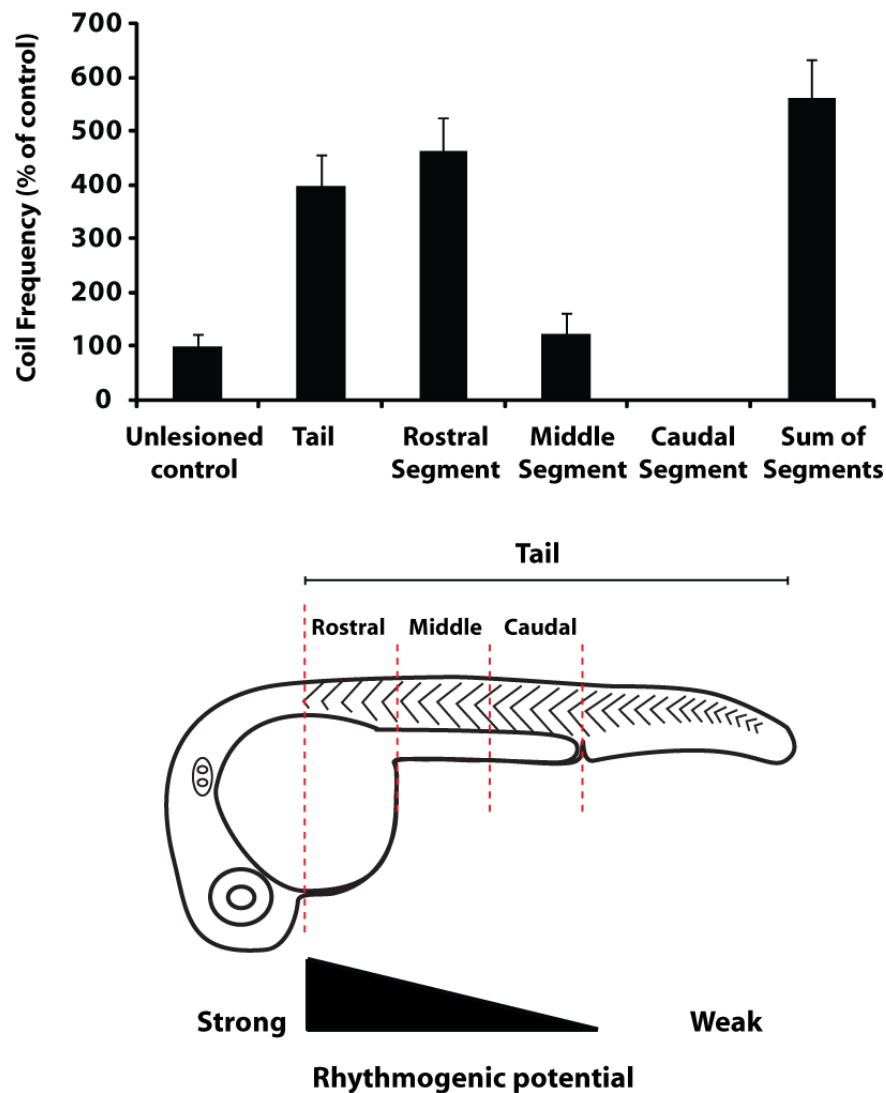
**Figure 6** (tirée de Pietri et al 2009, Figure 4A). Touch-response requires the rostral somites of the spinal cord, but not the hindbrain. (A) The trunks of embryos at 25 hpf were imaged after complete transection at the level of somites indicated. Movies were quantified for spontaneous coiling (SC) frequency normalized to the most rostral transection (upper panel). Embryo trunks from complete transections at the levels indicated were analyzed for touch response (TR). Responses were recorded as the percentage of embryos showing strong, weak, or no coils (lower panel).

Ces lésions ont contribué à l'élaboration d'une ébauche du circuit neuronal impliqué dans la réponse au toucher, tel que discuté à la fin de l'article. En effet, on suggère que les cellules sensorielles Rohon-Beard font des connexions synaptiques avec les corps cellulaires de neurones CoPA, puisque les CoPA semblent recevoir un influx glutamatergique en provenance des Rohon-Beard (voir annexe 3, figure 5). Les axones des CoPA traversent la moelle épinière au côté contralatéral, puis en direction rostral dans le DLF (Hale et al 2001). À ce point, il est possible que les axones des CoPA établissent des connections via des synapses glutamatergiques ou électriques avec les neurones CiD et IC (voir annexe 3, figure 6), qui, eux, contactent les motoneurones ipsilatéraux (Saint-Amant et Drapeau, 2001).

#### *Rôle critique de la moelle épinière rostrale dans les comportements immatures*

Nous avons démontré que la moelle épinière rostrale est requise pour les deux comportements immatures du poisson zébré, ce qui suggère que l'influx sensoriel recrute le même circuit que l'activité spontanée. Afin de mieux comprendre le rôle de cette région dans la création de rythmes moteurs, nous avons évalué la capacité de rythmogénèse de fragments de la moelle épinière rostrale. Ceci a permis d'identifier le substrat minimal requis pour la création d'activité motrice spontanée. Dans ce but, des fragments de 3 somites parmi les 15 premiers somites étaient produits, puis leur activité rythmique motrice enregistrée (Figure 7).





**Figure 7.** L'activité spontanée persiste dans des embryons lésés. En-haut, schéma des lésions exécutées, laissant la queue entière sans le rhombencéphale, ou des fragments de la queue. L'échelle de la capacité rythmogénique est inspirée de Ben-Ari 2001. Moyenne des fréquences d'activité spontanée des différents fragments de la queue, ainsi que la somme des fragments rostraux, milieux et caudaux, en pourcentage relatif aux témoins non-lésés. Les barres d'erreur représentent l'erreur type.

En exécutant ces lésions, on apercevait une diminution dans le nombre de contractions générées d'un fragment de queue à l'autre en direction caudale. En additionnant le nombre de contractions des différents fragments, la somme n'était pas significativement plus grande que le nombre de contractions de la queue. À présent, il est difficile d'expliquer l'augmentation d'activité observée dans les fragments lésionnés. Il est possible que cette activité soit due à un déséquilibre ionique, puisque les lésions mettent les neurones directement en contact avec le milieu expérimental.

Par ailleurs, les rythmes différents des fragments suggèrent une synchronisation de l'activité des cellules une fois connectées en circuit. Cependant, cette différence peut être due également à la direction céphalo-caudale du développement. Ainsi, le moyen le plus convaincant pour montrer la capacité d'un neurone à générer une activité rythmique est de l'isoler complètement du circuit dans lequel il se trouve, afin d'en enregistrer son activité ionique. Cette méthode peut soustraire la possibilité qu'un ou plusieurs autres neurones ont une influence sur cette activité.

Les travaux de Spitzer (1994 ; revue par Spitzer 2002) ont démontré la présence d'influx calciques spontanés dans différents neurones de la xénope. Pendant des périodes au-delà d'une heure, il enregistrerait les influx calciques à l'aide d'indicateurs calciques dans différentes cellules dissociées et maintenues en culture. Il décrit deux formes différentes d'influx, les pics et les vagues (de « spikes » et « waves », en anglais). Les pics se caractérisent par des influx rapides de calcium, sensibles au bloqueurs de canaux calciques à bas voltage d'activation, et peuvent être provoqué par dépolarisation. Les vagues, quant à elles, sont de plus longues durées, et représentant un influx calcique plus lent que les pics, insensibles au glutamate et à la dépolarisation. Les pics et les vagues sont abolis lorsqu'on retire le calcium extracellulaire.

Ces influx calciques contribuent à la différenciation neuronale. En stimulant ces neurones à différentes fréquences, il est possible d'induire une « conversion » du

neurotransmetteur principal exprimé par un neurone. Par exemple, un neurone à transmetteur principalement glutamatergique peut être converti en neurone principalement cholinergique. Ces expériences ont clairement démontré l'importance de l'activité neuronale lors du développement. Cependant, ces travaux démontrent un rôle développemental à l'activité neuronal qui précède l'apparition de l'activité motrice spontanée.

Nous voulions donc élaborer une stratégie pour enregistrer l'activité spontanée de neurones individuels de la moelle épinière. Sachant que l'activité spontanée est le résultat d'activité neuronal rythmique dépendant du calcium (Saint-Amant et Drapeau, 2000), nous postulons que lorsqu'on dissocie la moelle épinière du poisson-zébré et qu'on maintient les cellules en culture, nous devrions être capables d'observer ces influx transitoires avec un indicateur calcique, et donc trouver les cellules étant capables de générer une activité neuronale spontanée.

Afin de pouvoir identifier les neurones, nous avons dissocié les cellules d'embryons de lignées transgéniques exprimant la eGFP des sous-populations de cellules. Ainsi, nous avons utilisé les lignées Tub:eGFP (marquant tous les neurones) ainsi que Alx :eGFP (marquant plusieurs sous-types d'interneurones). Ceci nous permettrait de trouver des neurones à l'aide du marqueur fluorescent ayant des maxima d'absorption-excitation de 470 nm (vert). Les embryons anesthésiés ont été lésés de sorte à enlever tout ce qui était rostral à la moelle épinière afin d'avoir uniquement des cellules de la queue en culture, sans neurones du cerveau ou de cellules cardiaques, pouvant montrer, eux aussi, des influx calciques spontanés. Ensuite, nous avons utilisé l'indicateur calcique Rhod-2 AM (Molecular Probes, Invitrogen) perméable à la membrane cytoplasmique ayant des maxima d'absorption-excitation à 568 nm (rouge). À l'aide d'enregistrements de 2 à 4 minutes, nous avons pu trouver quelques cellules montrant un à 3 événements d'influx calciques (voir Figure 8).

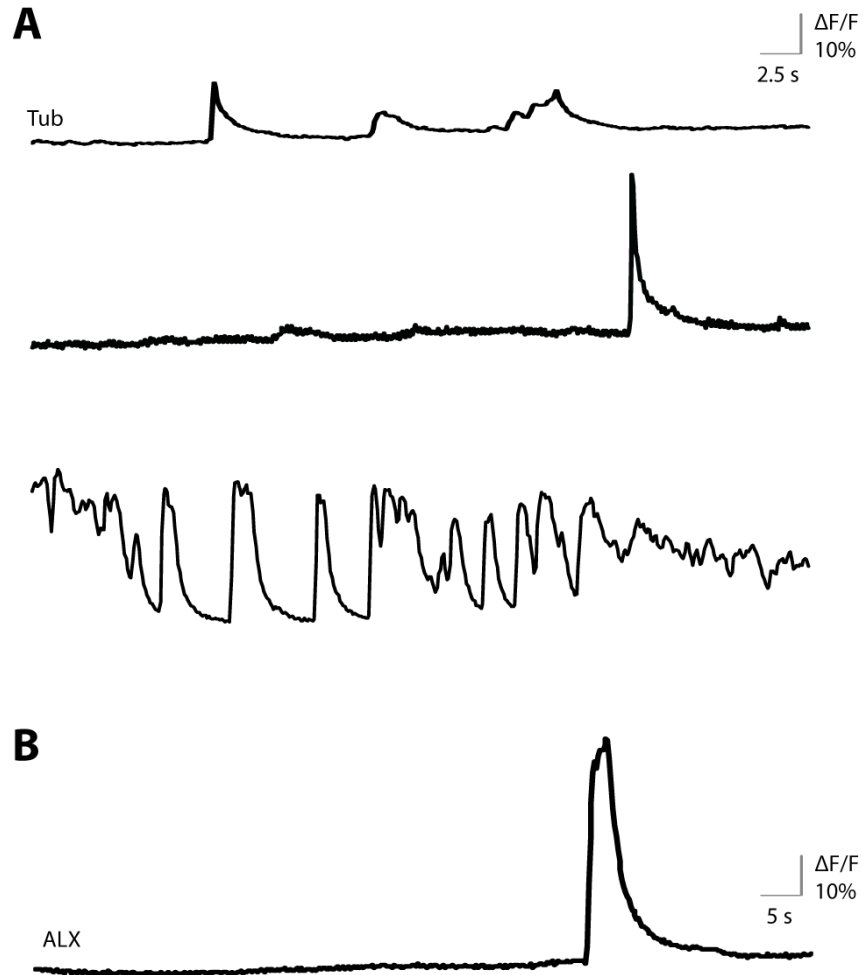


Figure 8. Imagerie calcique dans des cellules dissociées de l'embryon du poisson-zébré. Exemples de tracés de la variation de l'intensité de fluorescence de cellules individuelles dissociées de la queue d'embryons de poisson-zébré, traitées avec un indicateur calcique. En A, les tracés proviennent d'influx calciques dans des cellules d'embryons transgéniques Tub :eGFP, dans lequel tous les neurones sont marqués à la eGFP. En B, les tracés proviennent d'influx calciques dans des cellules d'embryons transgéniques Alx :eGFP, dans lequel les interneurones glutamatergiques sont marqués à la eGFP. En moyenne,  $68 \pm 4.1\%$  des cellules étaient marqués à la GFP, puis  $1.1 \pm 0.28\%$  montraient des influx calciques.

## Discussion

Les expériences de lésions ont démontrés le rôle critique de la partie rostrale de la moelle épinière au niveau de la réponse au toucher et de l'activité spontanée. De plus, la capacité rythmogénique de cette région semble diminuer d'un fragment à l'autre en direction céphalo-caudale, suggérant ainsi que les neurones qui s'y trouvent sont indispensable au circuit moteur. De plus, il existe une sous-population neuronale présente uniquement dans les six premiers somites. Ces cellules sont les « ipsilateral-caudally projecting cells » (cellules IC), qui sont actifs lors de l'activité spontanée (Saint-Amant et Drapeau, 2000). Ainsi, il est possible que ces neurones génèrent l'activité neuronale à la base de l'activité spontanée. De plus, il semble que la fréquence de contraction est proportionnelle au nombre de cellules IC dans le circuit.

Nous avons pu observer des événements d'influx calcique dans des neurones isolés de la moelle épinière. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse qu'il existe des neurones capables de générer une activité neuronale de façon intrinsèque. À l'avenir, il faudrait procéder à un marquage rétrograde de neurones à l'aide d'un indicateur fluorescent dans les lignées transgéniques, nous permettant d'identifier des cellules doublement marquées avant la dissociation, afin de les retrouver en culture. De plus, des enregistrements de plus longues durées permettraient de voir si l'activité que l'on observe se répète de façon rythmique. Vu l'effet des lésions sur l'activité spontanée, il est probable que la fréquence de l'activité spontanée des neurones isolés soit bien inférieure à celle des contractions de l'animal intact.

À l'avenir, il faudrait identifier avec précision la nature des neurones observés. Dans ces lignées, l'expression de la eGFP est visible dans plusieurs sous-types de neurones. Il est probable que les neurones « pacemakers » aient des axones descendants. Ils sont ainsi propices au marquage rétrograde, ce qui aiderait à l'identification des cellules.

Enfin, il est fort possible que les conditions non-physiologiques de la dissociation cellulaire modifient les propriétés oscillatoires des cellules. Pour remédier à cette situation à l'aide d'un test *in vivo*, il faudrait utiliser plusieurs la toxine Botulinum, qui bloque toute neurotransmission chimique ainsi que des bloqueurs de neurotransmission via les synapses électriques (Saint-Amant et Drapeau 2001). Cependant, la diversité génétique des connexines, les protéines qui forment les jonctions gap, rend très difficile le blocage complet de la transmission via les synapses électriques.

## **Chapitre 3 Étude du groupement des contractions spontanées chez l'embryon du poisson-zébré et pharmacologie**

Je décrirai ici des résultats qui sont parmi les plus récents que j'ai obtenus dans le laboratoire de Louis Saint-Amant. Je compte compléter ces expériences dans les mois suivant la rédaction de ce mémoire, avec l'intention d'en publier un article dans une revue scientifique.

## Introduction

### *Pharmacologie de l'activité spontanée*

Ayant déterminé que le circuit neuronal minimal nécessaire pour la réponse au toucher et pour l'activité spontanée se trouve dans la partie rostrale de la moelle épinière, il fallait ensuite caractériser l'activité en fonction de la pharmacologie de l'activité spontanée. En ciblant différents canaux avec des drogues, il serait possible d'évaluer la contribution de ces canaux en analysant le comportement. En effet, mesurer la fréquence, le groupement, et la durée des contractions des embryons traités aux drogues pourrait découvrir des pistes pour identifier la nature des circuits moteurs.

Les travaux sur la lamproie du laboratoire de Grillner ont pu montrer plusieurs propriétés électrophysiologiques ainsi que l'effet de différentes drogues dans l'activité neuronale sous-jacente à la nage de l'animal adulte (Grillner et al 2001). Par exemple, l'application d'apamin, une toxine d'abeille qui bloque les canaux potassiques activés par le calcium (el Manira et al 1994), résulte en une diminution de l'hyperpolarisation après un plateau de dépolarisation. Par ailleurs, bloquer des canaux calciques voltage-dépendants de type-L, de type-N et de type-P/Q, démontrent leur rôle au niveau du maintien du plateau de dépolarisation (Büschges et al 2000).

Cependant, ces analyses ont été effectuées chez des animaux adultes. De plus, l'activité neuronale sous-jacente à la nage dans la lamproie adulte implique une transmission synaptique excitatrice glutamatergique, générant l'excitation nécessaire pour dépolariser les motoneurones, ainsi que des neurones commissuraux inhibiteurs afin d'inhiber un côté de la moelle épinière, évitant ainsi des contractions bilatérales (revue par Buchanan 1996). Donc, pour tout effet observé dans des enregistrements de motoneurones, on ne peut clairement distinguer si le canal jouerait un rôle quant à la génération des



oscillations de potentiels membranaire, ou si son rôle se joue plutôt aux synapses, avec une influence sur la libération de transmetteur, et donc à la transmission du signal.

Les travaux d'enregistrements électrophysiologiques ont démontré que l'activité spontanée est composée de dépolarisations périodiques (PD) séparées par des bouffées d'activité synaptique ("synaptic bursts", SB) glycinergique. Les PD coïncident avec un SB contralatéral. La contraction d'un côté de la moelle épinière serait le résultat d'un PD du côté ipsilatéral et coïnciderait avec un SB contralatéral (Saint-Amant et Drapeau, 2000). Ces SB seraient la forme juvénile de l'inhibition mi-cycle nécessaire pour la coordination de la nage telle que vue chez la lamproie, et la grenouille (Buchanan 1996, Dale 1995).

Les PD dans la moelle épinière du poisson-zébré semblent presque entièrement transmises d'un neurone à l'autre via des synapses électriques. Les enregistrements de neurones individuels, ainsi que les résultats précédant, montrent une activité neuronale qui n'est aucunement bloqué lors d'ajout de bloqueurs de récepteurs glutamatergiques tels que CNQX, APV et acide kinurenique. L'ajout de la strychnine pour bloquer la transmission glycinergique des SB abolissait la composante synaptique qui, à 20 hpf, ne semblait pas affecter l'activité motrice. De plus, l'hypothèse que le couplage entre les neurones soit électrique est supportée par des enregistrements électrophysiologiques en paires. En effet, lorsque qu'on injecte du courant hyperpolarisant dans un neurone, on enregistre une hyperpolarisation corrélé dans un neurone qui y est couplé par synapse électrique. Finalement, l'activité neuronale était bloquée lors de l'exposition à la carbenoxolone, un bloqueur de jonctions gap (Saint-Amant et Drapeau, 2000; Saint-Amant et Drapeau, 2001).

Lors de l'activité spontanée, l'embryon du poisson-zébré présente un circuit neuronal rythmique et moteur dont la seule synapse chimique fonctionnelle, semble être la jonction neuromusculaire, de nature cholinergique. On parle donc d'une "synchronisation" entre les neurones d'un côté de la moelle épinière (Saint-Amant 2001), et ainsi d'un CPG de type pacemaker.

Ce système de rythme moteur embryonnaire pourrait servir de modèle afin de distinguer la contribution spécifique de différents courants ioniques au “pacemaking” plutôt qu’à la transmission synaptique et aux dynamiques de réseau. Il serait également possible d’évaluer la contribution de ces courants à la transmission synaptique, puisque la réponse au toucher et la nage requiert chacun une transmission synaptique glutamatergique (Pietri et al 2009). De plus, vers 24 hpf, l’activité glutamatergique des contractions en S pourrait être comparée à l’activité des contractions individuelles. Ainsi, nous avons procédé à exposer les embryons à des agents pharmacologiques ayant la propriété de bloquer différents canaux et récepteurs.

Il existe trois grandes méthodes pour observer l’activité neuronale d’un circuit moteur. Les enregistrements électrophysiologiques permettent d’observer à très haute résolution l’activité de une à deux neurones individuelles (Drapeau et al 1999). L’imagerie calcique permet d’observation d’activité neuronal dans plusieurs cellules, quoiqu’à plus basse résolution (Fetcho et O’Malley 1997). Finalement l’observation de l’activité motrice peut être corrélée à l’activité neuronale sous-jacente (Saint-Amant 1998 et 2000).

#### *Groupement des contractions spontanées*

Dans l’embryon de l’axolotl et du poulet, l’apparition d’un comportement intermédiaire entre l’activité spontanée et le comportement moteur plus mature (la nage et la marche, respectivement) ont été rapportés (revue par Hamburger 1963). Ce comportement consistait d’épisodes consistant de deux contractions successives alternatives, où la seconde contraction débute avant que la première n’ait fini. Ces épisodes faisaient en sorte que la queue de l’animal avait brièvement une forme de S. Ces « contractions en S » étaient considérées comme une étape intermédiaire importante entre l’apparition des contractions spontanée initiales, et le développement de comportements

plus complexes, tels la nage et la marche (Hamburger 1963). Ce comportement n'avait pas été observé chez le poisson-zébré.

Une description des premiers comportements moteurs de l'embryon du poisson-zébré a déjà été réalisée (Saint-Amant et Drapeau 1998). Cette étude démontre, entre autre, l'évolution de la fréquence des contractions spontanée avec le développement, ainsi que l'âge développemental de l'apparition de la réponse au toucher et de la nage. Pour calculer la fréquence de contractions, il suffit de compter le nombre de contractions ayant lieu durant une période de temps donnée (souvent 60 secondes), puis diviser par cette période de temps donnée. Plusieurs études ont par la suite utilisé la mesure de la fréquence de contractions afin de caractériser l'activité spontanée dans un mutant, dans des embryons traités avec une drogue, des MO, etc. (ie. Hirata et al 2005, Cui et al 2005). Quoique cette mesure offre une indication quantitative de l'activité motrice, elle ne tient pas compte du groupement épisodique ou non des évènements.

J'ai donc réexaminé l'activité spontanée en utilisant une mesure quantitative différente permettant d'observer le groupement des contractions, afin de voir si ce paramètre varie au cours du développement.

Pour observer l'effet sur le circuit, nous avons procédé à des analyses de l'activité motrice, notamment la fréquence et la durée des contractions ainsi que les intervalles de temps entre les contractions. Cette dernière mesure illustre la capacité de la moelle épinière à générer soit des contractions individuelles régulièrement espacées ou des épisodes de contractions rapides suivies de longues périodes de repos. Cette mesure peut nous fournir des indices quant au substrat neuronal impliqué.

Malgré que l'observation de l'activité motrice implique que l'activité neuronale observée exploite la jonction neuromusculaire, il s'agit d'une méthode plus rapide que l'enregistrement électrophysiologique d'activité neuronale, et permet de tester différents

composés plus rapidement. De plus, les résultats obtenus permettront de mieux planifier des enregistrements électrophysiologiques ou d'imagerie calciques qui vont permettre de confirmer ou d'infirmer nos déductions suite aux observations comportementales.

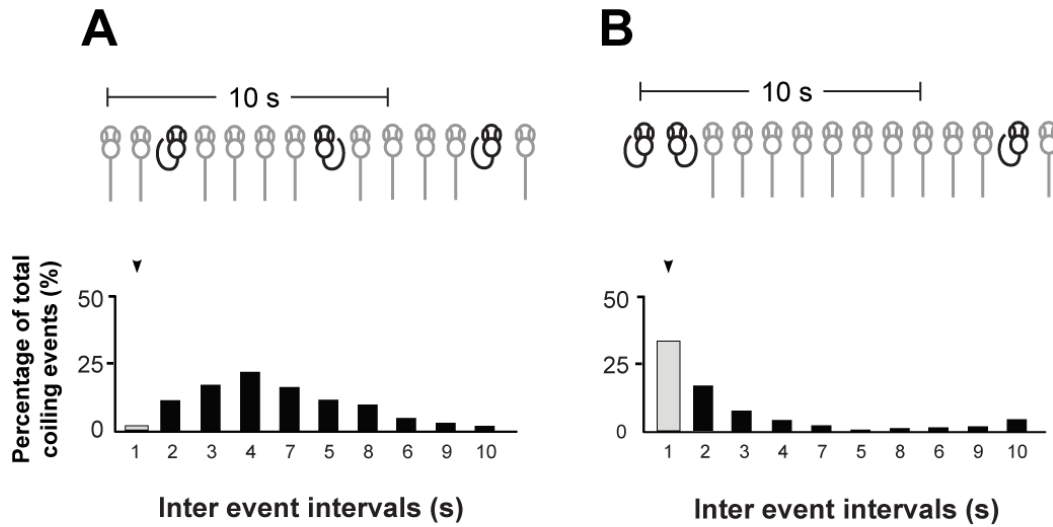
## Résultats

### *Activité spontanée transitoire dépendant du glutamate*

Nous avons entrepris l'observation de l'activité spontanée d'embryons à 24 hpf, soit à un stade développemental précédant la nage. Nous avons réussi à voir quelques épisodes de deux contractions, visuellement semblable aux contractions en S décrites. Cependant, cette observation n'était que qualitative. Nous avons donc élaboré une stratégie pour comparer de façon quantitative les contractions individuelles isolées et regroupées en épisode.

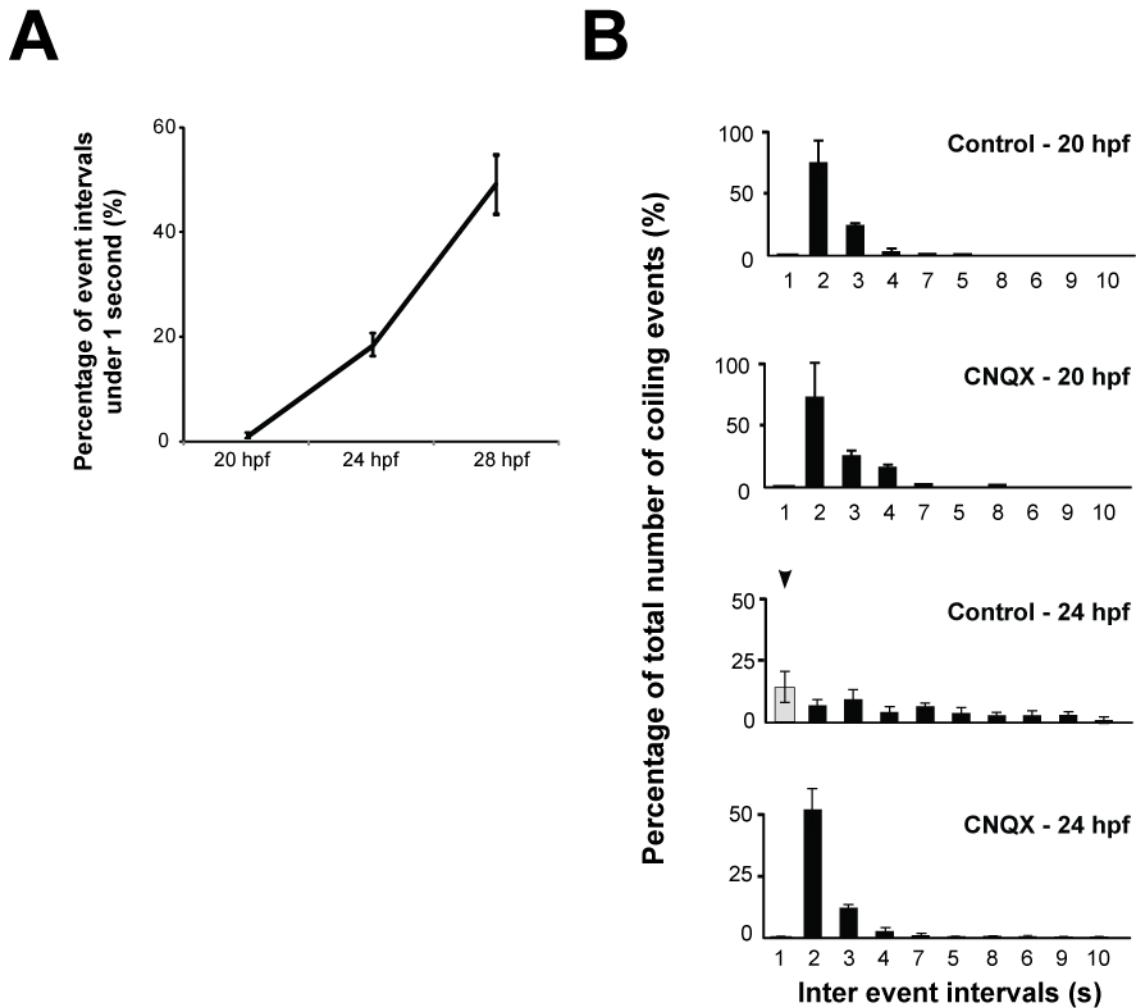
Plutôt que de calculer la fréquence, on peut quantifier le groupement des contractions en fonction de l'intervalle de temps entre les contractions.

Dans la figure 9, on démontre schématiquement une situation où la fréquence de contractions est la même, mais que le groupement des contractions est différent. Cette différence pourrait être le résultat d'activité neuronale différente. Ainsi, en quantifiant l'intervalle de temps entre deux contractions, nous pouvons établir la distribution des intervalles entre les contractions, et ce dans un temps choisi, qui sera constant d'un stade développemental à l'autre.



**Figure 9.** Schéma de différents patrons d'activité spontanée, soient des contractions individuelles isolées (en A), ou des évènements à multiples contractions (en B). Dans chaque, en haut, le schéma représente l'activité de l'embryon à travers le temps. Les graphiques en dessous montrent les distributions des intervalles de temps entre les évènements.

En procédant à la quantification chez l'embryon, en comptabilisant les intervalles d'activité, on remarque que dès 24 hpf, environ 18% des intervalles sont inférieures à 1 seconde (Figure 10A). En plus, on voit clairement que la proportion de contractions rapides augmente avec le développement, jusqu'à ce qu'elle devient d'environ 50% à 28 hpf, impliquant que la majorité de l'activité motrice se produit en épisodes de contractions à ce stade (Figure 10A), et ce, malgré que la fréquence générale des contractions diminue (Saint-Amant et Drapeau, 1998).



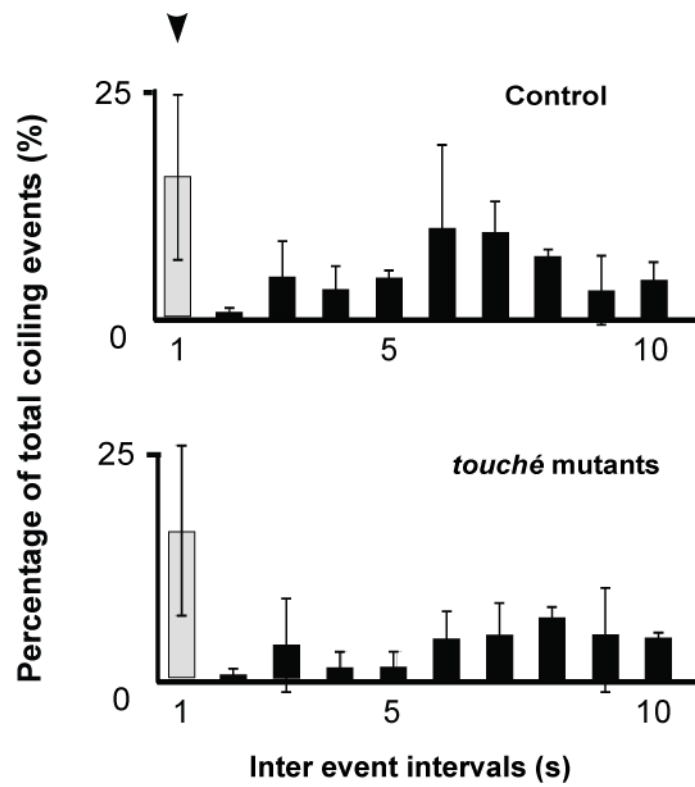
**Figure 10.** Distribution des intervalles entre les contractions spontanées. En A, pourcentage d'intervalles entre contractions spontanées étant de moins de 1 seconde à 20, 24 et 28 hpf. En B, distribution des intervalles entre les contractions spontanées à 20 hpf (haut) et 24 hpf (bas), chez des embryons témoins ou traités à la CNQX et à l'APV. Les barres d'erreur représentent l'erreur type.

Les contractions ayant des intervalles inférieurs à 1 seconde sont définies comme contractions en S. Ces contractions en S spontanées, chez l'axolotl ainsi que chez le poulet, représentent un comportement transitoire entre les contractions généralisées du tronc et celles de la nage (Hamburger 1963). Ainsi, nous soupçonnons qu'il s'agit d'une phase d'activité motrice importante pour le développement de la nage.

Nous avons donc formulé l'hypothèse que ces contractions en S partagent peut-être certaines propriétés avec les contractions natatoires. L'une des caractéristiques importantes des contractions de la réponse au toucher et de la nage est leur dépendance à la neurotransmission glutamatergique (Saint-Amant 2006 ; Buss et Drapeau 2001). Nous avons donc testé la dépendance glutamatergique des contractions en S et effectivement, la composante rapide des contractions spontanées à 24 hpf et à 28 hpf était abolie suite à l'injection de CNQX et d'APV, deux bloqueurs de réception glutamatergique (figure 10B). De plus, à 24 hpf, les contractions individuelles ayant des intervalles supérieures à 1 secondes, persistaient. Cette composante lente d'activité neuronale est probablement assurée par la persistance des connections électrique via les jonctions gap durant le développement.

Les épisodes de contractions ressemblent visuellement aux contractions de la réponse au toucher, en plus d'également nécessiter la transmission glutamatergique. Ainsi, il était possible que les contractions en S soit dû à des stimuli tactiles environnementaux ou endogène. Par exemple, des changements environnementaux soudains dans l'eau, ou même le contact entre l'embryon et le fond du plat de pétri pourraient déclencher une contraction en S. D'autre part, il était possible que lors d'une contraction, le contact entre le bout de la queue et la tête de l'animal déclenche une contraction contralatérale rapide. Il fallait démontrer que ces de contractions en S n'étaient pas une réponse sensorielle indétectable à l'observateur. Nous avons donc réexaminé le mutant *touché* (décrit au chapitre 1), qui est insensible aux stimuli tactiles.





**Figure 11** Distribution des intervalles entre les contractions spontanées à 24 hpf chez les embryons contrôles (haut) et les mutants *touché* (bas). Les barres d'erreur représentent l'erreur type.

En mesurant les intervalles entre les contractions spontanées, les mutants *touché* effectuaient des contractions à des intervalles inférieures à une seconde, et ce, à la même proportion que les embryons contrôles. Ainsi, puisque les mutants *touché* semblent effectuer des contractions en S, il est probable que ces contractions ne sont pas en réponse à des stimuli tactiles endogènes ou environnementaux.

### *Pharmacologie de l'activité spontanée*

À 20 hpf, le blocage de récepteurs glutamatergiques ne semblait pas affecter l'activité spontanée (voir Figure 10), nous avons donc essayé d'autres composés, afin d'élucider les contributions de paramètres ioniques et de neurotransmission à l'activité spontanée.

Mes résultats préliminaires indiquent les effets de quelques drogues affectant des composantes calciques à haut voltage d'activation, ainsi que les composantes potassiques et glycinergiques.

L'omega-conotoxin GVIA est une toxine isolée du venin d'un escargot marin. Plusieurs études démontrent sa spécificité pour les canaux calciques de type-N (Olivera et al 1994 ; Doering et Zamponi 2003). Chez la lamproie, l'application de cette toxine causait une dépression de l'activité synaptique excitatrice et inhibitrice, en plus d'une baisse de fréquence d'activité rythmique et d'un prolongement du plateau d'activité. Dans le poisson-zébré, l'injection de cette toxine a entièrement supprimé les contractions à 20 hpf (n=15 ; Figure 12)

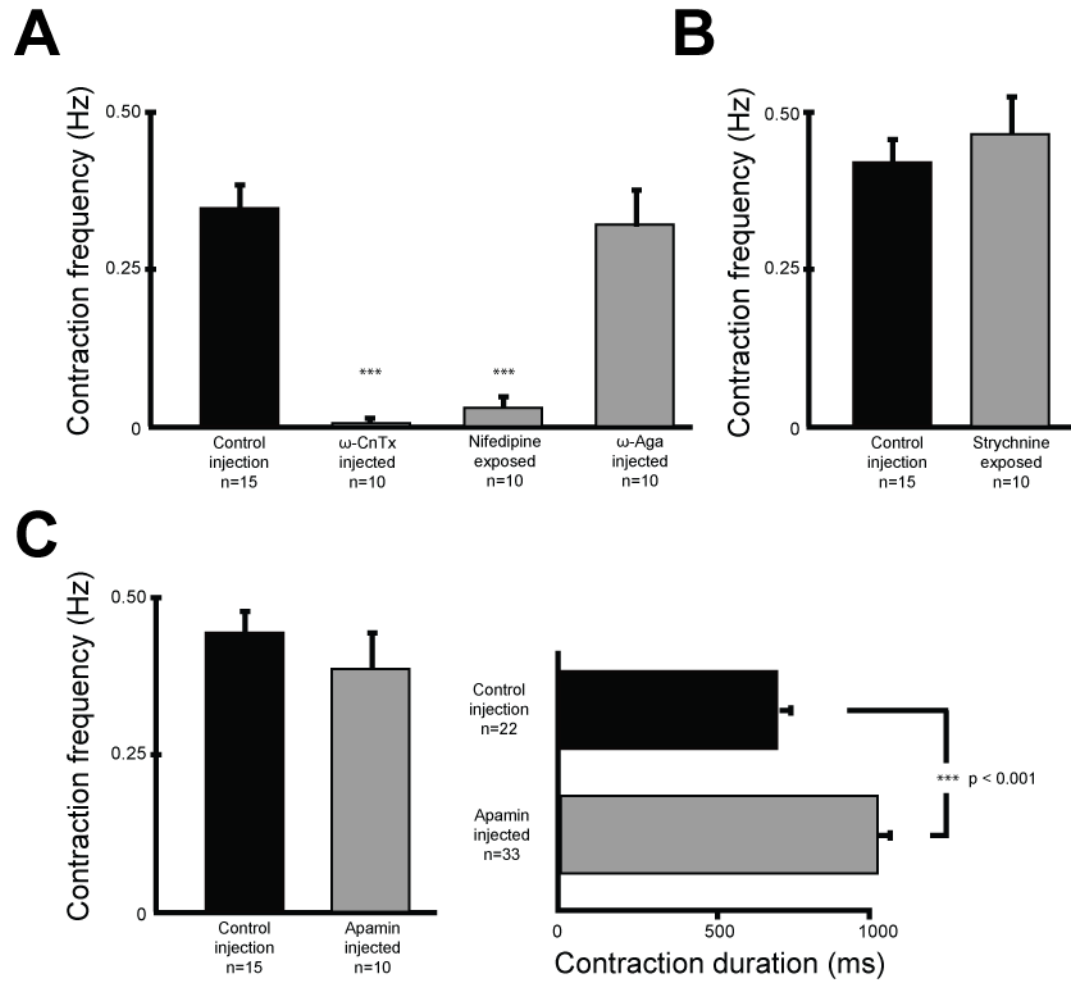
L'omega-agatoxin GVIA est une toxine isolée du venin d'une araignée *Agelenopsis aperta*, avec une spécificité démontrée pour les canaux calciques de type P/Q (Olivera et al 1994 ; Doering et Zamponi 2003). Chez la lamproie, l'application de cette toxine ne semblait pas affecter de façon significative le motif d'activité rythmique (Buschges et al

2000). Les résultats préliminaires chez le poisson-zébré semblent être en accord avec ceux de la lamproie (Figure 12).

Les dihydropyridines sont une classe d'agents pharmacologiques ayant une forte affinité pour les canaux calciques de type-L (Kass et al 1991). Chez la lamproie, l'application d'une dihydropyridine semble légèrement réduire la fréquence de l'activité, et légèrement augmenter la durée du plateau d'activité. En exposant les embryons de poisson-zébré à 100  $\mu$ M de nifédipine, une dihydropyridine hydrosoluble, on abolit entièrement les contractions spontanées à 20 hpf. (Figure 12).

L'apamin est une toxine isolée du venin d'abeille qui bloque les canaux potassiques activés par le calcium ( $K_{Ca}$ ) (Habermann et Fischer 1979). Chez la lamproie, l'application de cette drogue perturbe l'hyperpolarisation qui met fin aux plateaux d'activité. Ainsi, la durée du plateau d'activation était augmentée, surtout dans les rythmes plus lents, ce qui perturbe l'activité rythmique natatoire (El Manira et al 1994). Chez l'embryon du poisson-zébré, une augmentation de la durée du PD a été observée suite à l'application de l'apamin (Saint-Amant 2001). Au niveau comportemental, on voit une augmentation de la durée de contraction chez les embryons injectés à l'apamin. Ces contractions durent en moyenne 1.5 fois plus longtemps que chez les témoins (Figure 12).

Ensuite, nous avons testé l'effet de la strychnine, un agent qui bloque les récepteurs glycinergiques, sur l'activité spontanée. À la figure 12, on voit que l'application de cette drogue ne semble pas affecter l'activité spontanée. Ce résultat s'accorde avec l'étude d'un mutant, *bandoneon*, ayant un récepteur glycinergique perturbé (Hirata et al 2005), ainsi qu'avec des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* de neurones de poisson-zébrés exposés à la strychnine (Saint-Amant et Drapeau, 2001).



**Figure 12.** Résultats préliminaires du traitement d'embryons à 22 hpf avec des bloqueurs de canaux calciques, de canaux potassiques activés par le calcium, et de récepteurs glycinergiques. En A, la fréquence moyenne de l'activité spontanée à 22 hpf chez des embryons témoins ou traités avec la omega-conotoxin GVIA, la nifedipine, ou l'omega-agatoxine IVA. En B, la fréquence moyenne de l'activité spontanée à 22 hpf chez des embryons témoins ou traités avec la strychnine. En C, la fréquence moyenne de l'activité spontanée (gauche) et la durée moyenne des contractions (droite) chez des embryons témoins ou traités avec l'apamin. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type.

## Discussion

Cette étude nous a permis de trouver un aspect du comportement embryonnaire pré-natatoire qui dépend de la transmission glutamatergique, et qui pourrait être dépendant à l'apparition de la nage. Pour approfondir cette étude, il faudrait trouver d'où provient cette activité synaptique glutamatergique. L'analyse comportementale du mutant *touché* démontre que ces contractions en S ne sont pas en réponse à un stimulus tactile. Il est possible que cette activité glutamatergique provienne du rhombencéphale, tout comme la nage. Il est également possible que ce soit des synapses glutamatergiques au niveau des interneurons de la moelle épinière qui contribuent à produire ces contractions rapides.

Si l'activité provient du rhombencéphale, il serait possible que l'activité sous-jacente aux contractions en S représente l'une des premières étapes d'intégration fonctionnelle de cette structure aux circuits moteurs, puisque l'activité spontanée initiale et la réponse au toucher ne sont pas affectées suite à une ablation du rhombencéphale. Il faudrait donc refaire une série de lésions à 24 hpf afin d'examiner si les contractions en S sont abolies suite à l'ablation du rhombencéphale. Par ailleurs, l'exposition des embryons au NMDA provoque des épisodes de nage fictive lorsque l'animal est paralysé pour l'électrophysiologie. Si les contractions en S sont abolies par une lésion enlevant le rhombencéphale, il serait intéressant de déterminer si une exposition au NMDA peut rétablir ces contractions.

Finalement, il est possible que l'activité sous-jacente aux contractions en S soit due à la formation de synapses glutamatergiques dans la moelle épinière. Dans ce cas, la cinétique de propagation de la contraction serait probablement modifiée. Ainsi, on s'attendrait à ce que toutes les contractions aient la cinétique modifiée. La coexistence de contractions individuelles et de contractions en S suggèrent qu'une structure à l'extérieur du circuit moteur influe sur celui-ci pour provoquer sporadiquement des contractions en S.

Malgré que les mutants *touché* effectuent des contractions en S, il est possible que l'activité sous-jacente aux contractions en S provienne des cellules sensorielles Rohon-Beard, connues comme étant glutamatergiques (Higashijima et al, 2004a). Pour que ceci soit possible, il faudrait que ces neurones soient actifs spontanément, ou qu'ils soient sujets à la libération spontanée de neurotransmetteur. Cependant, jusqu'à présent aucun enregistrement électrophysiologique ne démontre une activité spontanée rythmique dans les neurones Rohon-Beard.

Quant aux autres bloqueurs testés, les résultats démontrent la possibilité d'utiliser l'analyse comportementale pour élucider l'activité neuronale à la base de l'activité spontanée. Il est à noter que la spécificité des toxines et des drogues utilisées peut être grandement influencée par la concentration utilisée, surtout dans le cas des bloqueurs calciques (Doering et Zamponi 2004). Il serait donc important d'essayer différentes concentrations de ces agents. Dans le cas où les concentrations utilisées ici sont trop fortes et causent un blocage moins spécifique de canaux, les résultats comportementaux supporteraient ceux obtenus préalablement en enregistrements électrophysiologiques (Saint-Amant et Drapeau 2000).

À l'avenir, des expériences d'observation d'activité motrice sur des embryons lésés ainsi que sur des embryons de lignées mutantes démontrant une déficience de neurotransmission au niveau des cellules sensorielles aideraient à la découverte des neurones à la base des contractions en S. Si il s'agit que cette activité soit liée à des synapses glutamatergiques entre les interneurones de la moelle épinière, il faudrait d'abord trouver ces synapses, et par la suite montrer qu'elles son fonctionnelles lors de l'activité spontanée. Si c'est le cas, il serait intéressant de déterminer leur localisation relative aux synapses électriques.

Ces résultats suggèrent une transition intéressante d'un circuit à connexions électriques vers un circuit à synapses chimiques glutamatergiques avant l'apparition de la nage. Alors que l'importance des synapses électriques ait été établie au niveau du couplage de motoneurones de divers circuits moteurs de vertébrés (Zhang et al 2009), la dépendance aux synapses électriques comme mode de transmission de signal principal outre la jonction neuromusculaire cholinergique représente un caractère plutôt ancestral, tel la locomotion chez l'embryon de la sangsue (Todd et al 2010).

Notre modèle étant établi, nous pourrons maintenant procéder à tester différents composés afin de définir si leurs cibles ont un rôle ou non sur les propriétés oscillatoires membranaires. La caractéristique « asynaptique » du CPG à pacemaker nous offre un système simple pour explorer la contribution de différentes composantes ionique à l'activité oscillatoire. De plus, le développement de celui-ci en CPG à dynamique de réseau nous offre un système comparatif. Finalement, à l'aide d'une observation précise du comportement, il sera possible de corréler les changements subtils de comportement avec des changements physiologiques du circuit sous-jacents. À l'aide des outils génétiques à notre disposition, il sera également possible de corréler ces changements avec les changements anatomiques qui ont lieu lors du développement. Ce genre de corrélation est à l'image des embryologistes pionniers tel Coghill et Hamburger.

# Conclusion

## Mécanismes de l'activité spontanée

Les résultats des chapitres précédents établissent une fondation pour élucider les mécanismes qui génèrent l'activité spontanée, ainsi que les neurones impliqués dans la génération et transmission de cette activité neuronale, qui se traduit en contractions musculaires. Nous proposons que l'embryon du poisson-zébré serait un modèle idéal pour étudier les propriétés oscillatoires d'un circuit, grâce à ses synapses électriques, et sa quasi-absence de synapses chimiques. Les travaux avec le mutant *touché* suggèrent que l'activité motrice se développe normalement sans influx sensoriels. Les résultats de lésions ainsi que d'imagerie calcique supportent l'hypothèse que les cellules IC sont génératrices de l'activité rythmique sous-jacente à l'activité spontanée. La vérification de cette hypothèse requiert le développement d'outils permettant un marquage *in vivo* de ces cellules.

Plusieurs laboratoires œuvrent à découvrir et à développer des promoteurs spécifiques à des populations cellulaires spécifique (revue par Baier et Scott, 2009). Ainsi, ces outils moléculaires permettraient de visualiser rapidement les cellules IC. Leur activité intrinsèque pourrait donc être observée une fois dissociées de l'animal. De plus, la visualisation facile des cellules IC permettrait d'entreprendre des enregistrements électrophysiologiques tout en bloquant la propagation de l'activité neuronale par des moyens pharmacologique. Ces expériences permettraient d'isoler les propriétés somatiques des propriétés synaptiques des neurones du CPG.

La motilité embryonnaire de plusieurs animaux commence par des contractions générales spontanées du tronc, suivi de contractions semblables en réponse à une stimulation tactile, puis se raffine à produire des mouvements locaux, exigeant une plus grande coordination et/ou précision au niveau du circuit neuronal sous-jacent. Le



comportement moteur intermédiaire spontané qu'on a découvert, soit les contractions rapides en S, peut signaler l'apparition de changements physiologiques au circuit moteur nécessaire pour le développement de la nage. Ces changements physiologiques pourraient consister de connexions fonctionnelles entre le rhombencéphale et le circuit moteur de la moelle épinière. Il faudrait donc déterminer si le rhombencéphale est impliqué dans les contractions en S, puis en mesurer l'activité. Pour ce faire, des expériences d'imagerie calciques permettraient d'observer s'il y a de l'activité spontanée au niveau du rhombencéphale qui pourrait être à la base des contractions en S.

### **Rôles de l'activité spontanée**

L'analyse des contractions en S pourraient devenir un outil intéressant pour des études impliquant l'embryon du poisson-zébré comme modèle de maladies. Dans ces projets de recherche, il est souvent important de démontrer la spécificité de la pathologie étudiée. Ainsi, des études comportementales accompagnent souvent ces études. L'analyse de l'activité spontanée à 24 hpf est plus rapide, et requiert moins de ressources que l'analyse de la nage à 28 hpf et plus. La présence ou non de contractions en S démontre la capacité des embryons à générer de l'activité glutamatergique dans les circuits moteurs, et peut révéler des problèmes développementaux.

Chez la sangsue, il existe un couplage important par synapses électriques entre plusieurs neurones du ganglion neuronal segmentaire (Hagiwara et Morita 1962) et ce lors de la phase embryonnaire de l'animal (Marin-Burgin et al 2005). Ce couplage électrique précède l'apparition des synapses chimiques. Récemment, il a été démontré par *knock-down* moléculaire que cette phase de couplage électrique est nécessaire à la formation de synapses chimiques chez la sangsue.

Ainsi, nous supposons qu'un principe semblable existe chez le poisson-zébré, et probablement d'autres animaux au travers l'évolution. Toutefois, les informations disponibles quant au rôle des synapses électriques lors de la phase embryonnaire sont nébuleuses. En plus de permettre le passage d'ions, assurant la propagation intercellulaire d'une dépolarisation, il a été démontré que les jonctions gap permettent le passage de molécules de signalisation, tel l'AMP cyclique, ainsi que l'inositol triphosphate (Bevans et Harris 1999; Niessen et al 2000). Cette communication intercellulaire pourrait donc être importante lors du développement des circuits moteurs, en plus des influx calciques transitoires décrits par Spitzer (1995).

L'ambiguïté concernant le circuit neuronal sous-jacent à l'activité spontanée ainsi que la difficulté technique de bloquer cette activité rendent difficile l'étude de rôle au niveau du développement. Il a été démontré que l'innervation de la peau par les neurites périphériques des cellules sensorielles est perturbée chez des embryons de poisson-zébré où la jonction neuromusculaire a été bloquée (Paulus et al 2009). Dans ce cas, ce ne sont que les contractions musculaires qui sont abolies, et non l'activité neuronale sous-jacente.

La proximité des CPG respectifs responsables de la locomotion et de la respiration a été rapportée préalablement, ainsi que la difficulté de distinguer expérimentalement les deux rythmes très tôt dans le développement du rat (Greer et al 1992). Il est donc possible que l'activité spontanée du poisson soit un artefact évolutif de la respiration chez les vertébrés supérieurs. Les contractions comme telles, qui causent un déplacement de l'eau environnante, pourrait permettre une meilleure oxygénation pour l'animal, et ce avant que 22 hpf, quand le cœur commence à battre (Stainier et al 1993), et que les tissus branchiaux ne soient actifs, soit vers 14 jours (Kimmel et al 1995).

## Bibliographie

- Angulo AW 1932. The prenatal development of behavior in the albino rat. *Journal of Comparative Neurology*. 55 : 395–442
- Baier H et Scott EK. 2009. Genetic and optical targeting of neural circuits and behavior – zebrafish in the spotlight. *Curr Opin Neurobiol*. 19:553-560
- Bean BP 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu.Rev.Physiol*. 51:367-384
- Bekoff A 1992. Neuroethological approaches to the study of motor development in chicks: achievements and challenges. *J Neurobiol* 23:1486-505.
- Bekoff A. 2001. Spontaneous embryonic motility: an enduring legacy. *Int.J.Dev.Neurosci*. 19:155-160
- Ben-Ari Y. 2001. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci*. 24:353-360
- Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L et Kuwada JY. 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J.Comp.Neurol*. 302:603-616
- Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L et Kuwada JY. 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J.Comp.Neurol*. 302:603-616
- Bevans CG et Harris AL, 1999. Direct high affinity modulation of connexin channel activity by cyclic nucleotides. *J. Biol Chem*, 274:3720-3725.
- Bidaut M. 1980. Pharmacological dissection of pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion using picrotoxin. *J.Neurophysiol*. 44:1089-1101
- Blatow M, Rozov A, Katona I, Hormuzdi SG, Meyer AH, Whittington MA, Caputi A et Monyer H. 2003. A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex. *Neuron* 38:805-817
- Boland LM, Morrill JA et Bean BP. 1994. omega-Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J.Neurosci*. 14:5011-5027
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J et Snutch TP. 1999. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat.Neurosci*. 2:407-415

- Bridgman CS et Carmichael L 1935. An experimental study of the onset of behavior in the fetal guinea pig. *J Genet. Psychol.* 47:247-267
- Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR et Drapeau P. 2003. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J.Physiol.Paris* 97:77-86
- Buchanan JT. 1982. Identification of interneurons with contralateral, caudal axons in the lamprey spinal cord: synaptic interactions and morphology. *J.Neurophysiol.* 47:961-975
- Buchanan JT et Grillner S. 1987. Newly identified 'glutamate interneurons' and their role in locomotion in the lamprey spinal cord. *Science* 236:312-314
- Buchanan JT. 1996. Lamprey spinal interneurons and their roles in swimming activity. *Brain Behav.Evol.* 48:287-296
- Buschges A, Wikstrom MA, Grillner S et El Manira A. 2000. Roles of high-voltage-activated calcium channel subtypes in a vertebrate spinal locomotor network. *J.Neurophysiol.* 84:2758-2766
- Buss RR et Drapeau P. 2001. Synaptic drive to motoneurons during fictive swimming in the developing zebrafish. *J.Neurophysiol.* 86:197-210
- Busselberg D, Evans ML, Rahmann H et Carpenter DO. 1991. Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia neurons. *J.Neurophysiol.* 65:786-795
- Cai Z et Kimelberg HK. 1997. Glutamate receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21:380-389
- Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16:521-555
- Coghill GE 1929, *Anatomy and the problem of behaviour*. Cambridge University Press. 113 pp.
- Coghill GE. 1930. The Structural Basis of the Integration of Behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 16:637-643
- Coghill GE et Legner WK 1937. Embryonic Motility and Sensitivity.

*Monographs of the Society for Research in Child Development*, 2:115

- Cui WW, Low SE, Hirata H, Saint-Amant L, Geisler R, Hume RI et Kuwada JY. 2005. The zebrafish shocked gene encodes a glycine transporter and is essential for the function of early neural circuits in the CNS. *J.Neurosci.* 25:6610-6620
- Cullheim S, Kellerth JO, Conradi S 1977. Evidence for direct synaptic interconnections between cat spinal alpha-motoneurons via the recurrent axon collaterals: a morphological study using intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 132:1-10.
- Cunningham AW et Rylander RJ 1961. Behavior of spontaneous potentials from chick cerebellar explant during 120 hours in culture. *J Neurophysiol.* 24:141-9
- Dale N. 1995. Experimentally derived model for the locomotor pattern generator in the *Xenopus* embryo. *J.Physiol.* 489 ( Pt 2):489-510
- De Koninck Y et Mody I 1996. The effects of raising intracellular calcium on synaptic GABAA receptor-channels. *Neuropharmacoll.* 35:1365-1374
- Doering CJ et Zamponi GW. 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J.Bioenerg.Biomembr.* 35:491-505
- Draguhn A, Traub RD, Schmitz D et Jefferys JG. 1998. Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:189-192
- Drapeau P, Ali DW, Buss RR et Saint-Amant L. 1999. In vivo recording from identifiable neurons of the locomotor network in the developing zebrafish. *J.Neurosci.Methods* 88:1-13
- Eisen JS et Smith JC. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 135:1735-1743
- el Manira A, Tegner J et Grillner S. 1994. Calcium-dependent potassium channels play a critical role for burst termination in the locomotor network in lamprey. *J.Neurophysiol.* 72:1852-1861
- Fetcho JR et O'Malley DM. 1997. Imaging neuronal networks in behaving animals. *Curr.Opin.Neurobiol.* 7:832-838

- Fetcho JR et Liu KS. 1998. Zebrafish as a model system for studying neuronal circuits and behavior. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 860:333-345
- Fetcho JR. 2007. The utility of zebrafish for studies of the comparative biology of motor systems. *J.Exp.Zool.B.Mol.Dev.Evol.* 308:550-562
- Friedman D et Strowbridge BW. 2003. Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J.Neurophysiol.* 89:2601-2610
- Fulton BP, Miledi R et Takahashi T. 1980. Electrical synapses between motoneurons in the spinal cord of the newborn rat. *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 208:115-120
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL 1992. Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord in vitro. *J Neurophysiol.* 67:996-9.
- Grillner S. 1985. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228:143-149
- Grillner S, Wallen P, Hill R, Cangiano L et El Manira A. 2001. Ion channels of importance for the locomotor pattern generation in the lamprey brainstem-spinal cord. *J.Physiol.* 533:23-30
- Grinnell AD. 1966. A study of the interaction between motoneurons in the frog spinal cord. *J.Physiol.* 182:612-648
- Gu X, Olson EC et Spitzer NC. 1994. Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J.Neurosci.* 14:6325-6335
- Gu X et Spitzer NC. 1995. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous  $Ca^{2+}$  transients. *Nature* 375:784-787
- Habermann E et Fischer K 1979. Bee venom neurotoxin (apamin): iodine labeling and characterization of binding sites. *Eur J Biochem.* 94:355-64
- Hagiwara S et Morita H. 1962. Electrotonic transmission between two nerve cells in leech ganglion. *J.Neurophysiol.* 25:721-731
- Hale ME, Ritter DA, Fetcho JR 2001. A confocal study of spinal interneurons in living larval zebrafish. *J Comp Neurol* 437:1-16
- Hamburger V et Hamilton L 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88:49-92

- Hamburger V. 1963. Some Aspects of the Embryology of Behavior. *Q.Rev.Biol.* 38:342-365
- Hanson MG et Landmesser LT. 2004. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron* 43:687-701
- Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S et Bading H. 1998. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 23:131-134
- Higashijima S, Masino MA, Mandel G et Fetcho JR. 2003. Imaging neuronal activity during zebrafish behavior with a genetically encoded calcium indicator. *J.Neurophysiol.* 90:3986-3997
- Higashijima S, Mandel G et Fetcho JR. 2004. Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J.Comp.Neurol.* 480:1-18
- Higashijima S, Schaefer M et Fetcho JR. 2004. Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *J.Comp.Neurol.* 480:19-37
- Hirata H, Saint-Amant L, Downes GB, Cui WW, Zhou W, Granato M et Kuwada JY. 2005. Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:8345-8350
- Hirata H. 2007. Locomotion research with zebrafish. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 27:127-134
- Ide CF et Tompkins R. 1975. Development of locomotor behavior in wild type and spastic (sp/sp) axolotls, *Ambystoma mexicanum*. *J.Exp.Zool.* 194:467-478
- Iida K, Tada T et Iida H. 2004. Molecular cloning in yeast by in vivo homologous recombination of the yeast putative alpha1 subunit of the voltage-gated calcium channel. *FEBS Lett.* 576:291-296
- Ivanchenko MV, Thomas N, Selverston AI et Rabinovich MI. 2008. Pacemaker and network mechanisms of rhythm generation: cooperation and competition. *J.Theor.Biol.* 253:452-461

- Kass RS, Arena JP et Chin S. 1991. Block of L-type calcium channels by charged dihydropyridines. Sensitivity to side of application and calcium. *J.Gen.Physiol.* 98:63-75
- Kimmel CB, Patterson J et Kimmel RO. 1974. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Dev.Psychobiol.* 7:47-60
- Kuwada JY, Bernhardt RR et Nguyen N. 1990. Development of spinal neurons and tracts in the zebrafish embryo. *J.Comp.Neurol.* 302:617-628
- Landmesser LT et O'Donovan MJ. 1984. Activation patterns of embryonic chick hind limb muscles recorded in ovo and in an isolated spinal cord preparation. *J.Physiol.* 347:189-204
- Large EW et Snyder JS. 2009. Pulse and meter as neural resonance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1169:46-57
- Liu KS et Fetcho JR. 1999 Laser Ablations Reveal Functional Relationships of Segmental Hindbrain Neurons in Zebrafish. *Neuron* 23: 325-35
- Low SE, Ryan J, Sprague SM, Hirata H, Cui WW, Zhou W, Hume RI, Kuwada JY et Saint-Amant L. 2010. *touché* is required for touch-evoked generator potentials within vertebrate sensory neurons. *J.Neurosci.* 30:9359-9367
- Luna VM et Brehm P. 2006. An electrically coupled network of skeletal muscle in zebrafish distributes synaptic current. *J.Gen.Physiol.* 128:89-102
- Marin-Burgin A, Eisenhart FJ, Baca SM, Kristan WB,Jr et French KA. 2005. Sequential development of electrical and chemical synaptic connections generates a specific behavioral circuit in the leech. *J.Neurosci.* 25:2478-2489
- McLean DL et Fetcho JR. 2008. Using imaging and genetics in zebrafish to study developing spinal circuits in vivo. *Dev.Neurobiol.* 68:817-834
- Narayanan CH, Fox MW et Hamburger V. 1971. Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Behaviour* 40:100-134
- Nasevicius A et Ekker SC. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat.Genet.* 26:216-220



- Niessen H, Harz H, Bedner P, Kramer K et Willecke K, 2000. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *J Cell Sci*, 113:1365-1372.
- Nishimaru H, Iizuka M, Ozaki S et Kudo N. 1996. Spontaneous motoneuronal activity mediated by glycine and GABA in the spinal cord of rat fetuses in vitro. *J.Physiol.* 497:131-143
- Obata K, Oide M et Tanaka H. 1978. Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res.* 144:179-184
- O'Donovan MJ et Landmesser L. 1987. The development of hindlimb motor activity studied in the isolated spinal cord of the chick embryo. *J.Neurosci.* 7:3256-3264
- O'Donovan MJ, Chub N et Wenner P. 1998. Mechanisms of spontaneous activity in developing spinal networks. *J.Neurobiol.* 37:131-145
- O'Donovan MJ, Wenner P, Chub N, Tabak J et Rinzel J. 1998. Mechanisms of spontaneous activity in the developing spinal cord and their relevance to locomotion. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 860:130-141
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J et Adams ME. 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu.Rev.Biochem.* 63:823-867
- Paidhungat M et Garrett S. 1997. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated  $Ca^{2+}$  uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Mol.Cell.Biol.* 17:6339-6347
- Paulus JD, Willer GB, Willer JR, Gregg RG et Halloran MC. 2009. Muscle contractions guide rohon-beard peripheral sensory axons. *J.Neurosci.* 29:13190-13201
- Pietri T, Manalo E, Ryan J, Saint-Amant L et Washbourne P. 2009. Glutamate drives the touch response through a rostral loop in the spinal cord of zebrafish embryos. *Dev.Neurobiol.* 69:780-795
- Preyer W, 1885 *Specielle Physiologie des Embryo*. Grieben, Leipzig, p 644

- Ribera AB et Nusslein-Volhard C. 1998. Zebrafish touch-insensitive mutants reveal an essential role for the developmental regulation of sodium current. *J.Neurosci.* 18:9181-9191
- Rohrbough J et Spitzer NC. 1996. Regulation of intracellular Cl<sup>-</sup> levels by Na(+)-dependent Cl<sup>-</sup> cotransport distinguishes depolarizing from hyperpolarizing GABAA receptor-mediated responses in spinal neurons. *J.Neurosci.* 16:82-91
- Rybak IA, Shevtsova NA, Paton JF, Dick TE, St-John WM, Morschel M et Dutschmann M. 2004. Modeling the ponto-medullary respiratory network. *Respir.Physiol.Neurobiol.* 143:307-319
- Saint-Amant L et Drapeau P. 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J.Neurobiol.* 37:622-632
- Saint-Amant L et Drapeau P. 2000. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J.Neurosci.* 20:3964-3972
- Saint-Amant L et Drapeau P. 2001. Synchronization of an embryonic network of identified spinal interneurons solely by electrical coupling. *Neuron* 31:1035-1046
- Saint-Amant L et Drapeau P. 2003. Whole-cell patch-clamp recordings from identified spinal neurons in the zebrafish embryo. *Methods Cell Sci.* 25:59-64
- Saint-Amant L 2006. Development of motor networks in zebrafish embryos. *Zebrafish* 3:173-190
- Selverston AI et Miller JP. 1980. Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. I. Pyloric system. *J.Neurophysiol.* 44:1102-1121
- Simon M, Perrier JF et Hounsgaard J. 2003. Subcellular distribution of L-type Ca<sup>2+</sup> channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the turtle. *Eur.J.Neurosci.* 18:258-266
- Spitzer NC. 1995. Spontaneous activity: functions of calcium transients in neuronal differentiation. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 2:379-386
- Spitzer NC. 2002. Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *J.Physiol.Paris* 96:73-80

- Stainier DY, Lee RK et Fishman MC. 1993. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development* 119:31-40
- Swammerdam J 1752. Bibel der Natur. Leipzig.– cité via Preyer (1885), dans la traduction par Coghill et Legner (1937).
- Tabak J, Senn W, O'Donovan MJ et Rinzel J. 2000. Modeling of spontaneous activity in developing spinal cord using activity-dependent depression in an excitatory network. *J.Neurosci.* 20:3041-3056
- Todd KL, Kristan WB, French KA 2010. Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation. *J Neurosci* 30:15277-85
- Tresch MC et Kiehn O. 2000. Motor coordination without action potentials in the mammalian spinal cord. *Nat.Neurosci.* 3:593-599
- Tsien RW, Ellinor PT et Horne WA. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol.Sci.* 12:349-354
- Van Mier P, Armstrong J, Roberts A. 1989. Development of early swimming in *Xenopus laevis* embryos: myotomal musculature, its innervation and activation. *Neuroscience.* 32:113-26.
- Weber SA et Ross LS. 2003. Gap junctional coupling in the olfactory organ of zebrafish embryos. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 143:25-31
- Wenner P et O'Donovan MJ. 2001. Mechanisms that initiate spontaneous network activity in the developing chick spinal cord. *J.Neurophysiol.* 86:1481-1498
- Zhang HY, Li WC, Heitler WJ, Sillar KT 2009. Electrical coupling synchronises spinal motoneuron activity during swimming in hatchling *Xenopus* tadpoles. *J Physiol.* 15 :4455-66
- Zhang M, Moller M, Broman J, Sukiasyan N, Wienecke J et Hultborn H. 2008. Expression of calcium channel CaV1.3 in cat spinal cord: light and electron microscopic immunohistochemical study. *J.Comp.Neurol.* 507:1109-1127

## Annexe 1

**Tableau I. Statistiques de la figure 2**

Témoins WT			Mutants <i>touché</i>		
0.05	±	0.00	0.05	±	0.00

**Tableau II. Statistiques de la figure 6 :**

Full	100	±	21.6477583
Tails	397.830018	±	58.8344498
Rostral	463.291139	±	62.050666
Middle	121.835443	±	38.5250312
Caudal	0	±	0

**Tableau III. Statistiques de la figure 9**

A :

	Pourcentage d'évènements de moins de 1 seconde		
20 hpf	0.78975079	±	0.24921025
24 hpf	18.0998954	±	4.59
28 hpf	49.8	±	6.2

B :

Témoins			Injections CNQX-APV		
0.78975079	±	0.24921025	0.51282051	±	0.51282051
75.1421551	±	17.8448578	79.5316588	±	13.5452643
98.3783784	±	1.62162162	97.2789116	±	2.72108844
99.7297297	±	0.27027027	100	±	1.0049E-14
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0
100	±	1.0049E-14	100	±	0

Témoins			Injections CNQX-APV		
18.0998954	±	4.59	0	±	0.00
24.4695401	±	4.13	7.01959331	±	4.64
35.920314	±	5.80	29.1713789	±	12.72

41.2402612	±	7.71	41.7230227	±	14.90
49.8264585	±	8.39	50.6578033	±	14.00
54.4909143	±	9.95	59.2501161	±	13.48
59.1063573	±	9.94	64.4998234	±	13.28
65.1374143	±	8.72	69.102008	±	12.36
69.4167228	±	8.52	74.7724597	±	9.85
73.0544064	±	6.83	81.6293504	±	7.11
75.2589892	±	6.30	86.5738613	±	5.07
78.5673952	±	5.52	87.3772192	±	4.75
81.1199297	±	5.92	88.2030493	±	4.87
84.3053356	±	4.62	89.2261875	±	4.54
85.8986322	±	4.87	91.3931818	±	3.71
88.5700684	±	4.19	93.4161588	±	3.50
89.055596	±	4.20	94.3102647	±	3.55
90.8109648	±	3.31	95.3334028	±	3.74
90.979032	±	3.38	96.5098734	±	2.48
91.6089923	±	3.60	96.7296536	±	2.47
100	±	0.00	100	±	0.00

**Tableau IV. Statistiques de la figure 10**

A :

	Témoins	omega-conotoxin GVIA
Fréquence moyenne de contractions	0.035 ± 0.003	0.001 ± 0.001
		Nifedipine
		0.0025 ± 0.002
		omega-agatoxin IVA
		0.031 ± 0.005

B :

	Témoins	Strychnine
Fréquence moyenne de contractions	0.042 ± 0.0032	0.045 ± 0.0057

C :

	Témoins	apamin
Fréquence moyenne de contractions	0.043 ± 0.004	± 0.007
Durée moyenne des contractions	723 ± 29.1	1027 ± 25.3

## Annexe 2

Journal Section: Behavioral/Systems/Cognitive

Title: *touché* is required for touch evoked generator potentials within vertebrate sensory neurons

Abbreviated title: *touché* is required for responsiveness to touch

Authors: Sean E. Low<sup>1</sup>, Joel Ryan<sup>1</sup>, Shawn M. Sprague<sup>2</sup>, Hiromi Hirata<sup>2</sup>, Wilson W. Cui<sup>2</sup>, Weibin Zhou<sup>2</sup>, Richard I. Hume<sup>2</sup>, John Y. Kuwada<sup>2</sup> and Louis Saint-Amant<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, GRSNC, CENUM, Université de Montréal, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montréal, QC, Canada. <sup>2</sup>Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

Keywords: Somatosensory, Mechanosensory, Touch, Mutant, Nociception, Patch Clamp

### Note de la Direction des bibliothèques relativement à la diffusion électronique de ce mémoire

Référence bibliographique de l'article retiré:

Low SE, Ryan J, Sprague SM, Hirata H, Cui WW, Zhou W, Hume RI, Kuwada JY, Saint-Amant L (2010) *touché* is required for touch-evoked generator potentials within vertebrate sensory neurons. *J Neurosci* 30:9359–9367.  
<<http://www.jneurosci.org/content/30/28/9359>>



## **Annexe 3**

### **Glutamate Drives the Touch Response through a Rostral Loop in the Spinal Cord of Zebrafish Embryos**

Thomas Pietri <sup>1</sup>, Elise Manalo <sup>1</sup>, Joel Ryan <sup>2</sup>, Louis Saint-Amant <sup>2</sup> and Philip Washbourne <sup>1#</sup>

1 Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, OR, USA

2 Department of Pathology and Cellular Biology, GRSNC, CENUM, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

Running Title: Touch response via rostral spinal cord

#### **Note de la Direction des bibliothèques relativement à la diffusion électronique de ce mémoire**

Référence bibliographique de l'article retiré:

Pietri, T., Manalo, E., Ryan, J., Saint-Amant, L. and Washbourne, P. (2009), Glutamate drives the touch response through a rostral loop in the spinal cord of zebrafish embryos. *Devel Neurobio*, 69: 780–795. doi: 10.1002/dneu.20741  
<<http://dx.crossref.org/10.1002%2Fdneu.20741>>